



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS

SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Evaluación experimental de la virulencia de tres cepas
de *Rubulavirus porcino* en ratones CD-1 y BALB/C”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

Rodríguez Espinosa Leonardo Raúl

ASESOR:

Dr. José Francisco Rivera Benítez

COASESOR:

M.C. Luis Gómez Núñez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2017



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

Evaluación experimental de la virulencia de tres cepas de R ubulavirus porcino en ratones CD-1 y BALB/c

Que presenta el pasante: **LEONARDO RAÚL RODRÍGUEZ ESPINOSA**
Con número de cuenta: **30531931-7** para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de enero de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Raúl Arturo Mar Cruz	
VOCAL	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
SECRETARIO	M.V.Z. Jesús Arturo Sandoval Romero	
1er SUPLENTE	M. en C. Gerardo Arcila López Tello	
2do SUPLENTE	Dra. Yasmín Guadalupe De Loera Ortega	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)
LMCF/ntm*

DEDICATORIA

A mis padres Pablo R.M. y Carolina G. E.S. por haber estado en constante apoyo con todo y en todo momento, brindando palabras sabias, haber entendido mejor que yo lo difícil del recorrido y haber creído en mi por encima de todos los tropiezos, errores y contratiempos que se presentaron en el camino desde el principio hasta el final.

A mis primos y tíos por ambos lados, paternos y maternos, que constantemente me preguntaban por mi situación académica y haber compartido experiencias similares, mis tíos que con su ejemplo explicaron lo duro de vivir con oficios varios y mis primos que siempre motivaron a seguir con el esfuerzo de alcanzar una profesión, siendo nuestra generación la primera en nuestras familias en tener carreras, apreciarlas y vivir con mejor calidad de éstas.

A mis hermanas que siempre han mostrado respeto frente a mis esfuerzos y sutil admiración del cómo aplico lo entendido de la carrera de medicina veterinaria y zootecnia a mi vida diaria; siendo yo el mayor, el primogénito, he asumido la responsabilidad del ser ejemplo para ustedes y a pesar de todas las dificultades personales de las que han sido testigos, he aquí el resultado de ser constante y dedicado en lo académico.

A mis amigos de la preparatoria con los que cada quien desde su perspectiva mostró lo valioso que es el estudio y el compartir momentos que nunca volverá a ocurrir, demostrando que haciendo el esfuerzo de estar presentes es un bálsamo para el alma y una fuente de esperanza de que a cualquier problema se le puede hacer frente y brindar lo mejor que hay en cada uno de nosotros para dar una pronta solución, principalmente en aspectos personales, pero seguro y prontamente en aspectos profesionales. En este punto de mi vida fue que decidí entrar a la carrera y agradezco mucho la motivación de entrar a tan difícil y bella profesión.

A mis amigos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán tanto Medicina Veterinaria y Zootecnia como de las carreras de Ingeniería Agrícola, Ingeniería Mecánica Eléctrica, Ingeniería en Telecomunicaciones Sistemas y Electrónica, Tecnología, Contaduría y Administración de Empresas, con los que observé ampliamente el panorama de la carrera veterinaria y sus múltiples aplicaciones sociales, culturales y la capacidad que se tiene de hacer mancuerna multidisciplinaria en aras de alcanzar un desarrollo palpable

para la situación nacional y personal. Para que nunca se acaben las ganas de sonreír ni de caminar con la vista al frente.

A todos los maestros y docentes de la trayectoria académica desde los estudios básicos, hasta el nivel licenciatura, por todos sus conocimientos que abarcan puntos personales, técnicos y profesionales, las palabras sabias y científicas nunca serán olvidadas y han repercutido en mi existencia. Jamás acabaré de agradecer a todos mis maestros y docentes, vivos y muertos, que aún me recuerdan y saludan al caminar entre los pasillos de la UNAM y aquellos que entre miles de niños me han olvidado o me recuerdan vagamente de la SEP.

A mis asesores, compañeros profesionales, maestros y doctores del INIFAP sin su apoyo jamás se hubiera concluido ésta tesis ni hubiera conocido el giro de la investigación en el laboratorio de virología, su impacto social, el rigor científico con que se debe realizar el trabajo y la auténtica disciplina con que se debe realizar las actividades para que los resultados sean irrefutables, admirables y de aplicación para el desarrollo nacional.

A todos los animales tanto los que su destino fue de aprovechamiento académico, a los que a diario abastecen a la población humana de recursos y conocimientos, los que fueron y son compañía personal y los que son pacientes propios y ajenos. No estamos solos en el universo, sino que están ustedes acompañándonos y que, sin raciocinio, dan diario ejemplos de humanidad a los que son observadores.

Agradecimientos institucionales

El presente trabajo de tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). El estudio fue financiado por el proyecto de investigación: “Identificación y caracterización de variantes genéticas y antigénicas del *Rubulavirus porcino*; y de sus parámetros histopatológicos e inmunológicos”; Recursos Fiscales INIFAP No. SIGI. 19144832016.

Se agradece el apoyo técnico del Histotecnólogo Alfredo Amadeo Díaz Estrada del Departamento de Producción y Zootecnia de Aves de la FMVZ, UNAM, por el procesamiento de las muestras para la evaluación histológica.

Al Dr. Armando Pérez Torres por su apoyo en la evaluación e interpretación histológica.

A la Dra. Sandra Cuevas Romero por su apoyo en el desarrollo de las pruebas de ELISA.

A todo el personal e investigadores del laboratorio de Virología del CENID-Microbiología Animal del INIFAP, por hacer posible el desarrollo del presente estudio.

El autor da el consentimiento a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario

Leonardo Raúl Rodríguez Espinosa

NOMBRE Y FIRMA DEL AUTOR

Índice

	Pág.
Abreviaturas	i
Lista de cuadros	ii
Lista de figuras	iii
Lista de cuadros en anexo	iv
Lista de figuras en anexo	v
1.- Resumen	vi
2.- Introducción	1
3.- Marco teórico	7
4.- Objetivos	10
5.- Hipótesis	11
6.- Material y métodos	12
7.- Resultados	18
8.- Discusión	42
9.- Conclusiones	45
10.- Referencias	46
11.- Anexo	51

I. Abreviaturas

Ac: anticuerpo.

Ag: antígeno.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

BSA: (siglas en inglés) albúmina bovina sérica.

CENID-MA: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal.

DL_{50%}: dosis letal 50%.

DICC_{50%}: dosis infectante cultivo celular 50%.

ELISA: (siglas en inglés) ensayo ligado a enzimas inmunoabsorbentes.

EOA: Enfermedad del ojo azul.

GR: glóbulos rojos.

HA: hemoaglutinación.

HN: hemaglutinina-neuraminidasa.

IHA: inhibición de la hemoaglutinación.

INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

ml: mililitros.

mm: milímetros.

nm: nanómetros.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

PBS: (siglas en inglés) solución amortiguada de fosfatos.

P.I.: post inoculación.

PorPV: (nomenclatura internacional en inglés) *Rubulavirus porcino*.

qRT-PCR: (siglas en inglés) reacción cadena polimerasa por transcriptasa reversa en tiempo real.

RVP: *Rubulavirus porcino*.

SFB: suero fetal bovino.

TMB: tetrametilbencidina.

VLPM: Virus La Piedad, Michoacán.

µL: microlitros.

µm: micrómetros.

II. Lista de cuadros

Cuadro 1. Identificación de *Rubulavirus porcino* en diferentes estados de México (Fuente: Martínez *et al.*, 2015).

Cuadro 2. Principales enfermedades que afectan a los cerdos en México.

Cuadro 3. Identificación de ácido neuramínico α -2,3Galactosa y antígeno viral en tejidos porcinos.

Cuadro 4. Diseño experimental para determinar la susceptibilidad de los ratones BALB/c y CD-1 frente a la infección con RVP.

Cuadro 5. Diseño experimental para determinar la dosis letal en ratones BALB/c y CD-1 empleando diferentes cepas del RVP.

Cuadro 6. Identificación de los ratones empleados para la evaluación histológica posterior a la infección experimental con el RVP.

Cuadro 7. Protocolo de amplificación de qRT-PCR para la amplificación del gen N del RVP.

Cuadro 8. Porcentaje de mortalidad en diferentes grupos de ratones BALB/c inoculados con las cepas de RVP.

Cuadro 9. Porcentaje de mortalidad en diferentes grupos de ratones CD-1 inoculados con las cepas de RVP.

Cuadro 10. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-VLPM en los ratones BALB/c.

Cuadro 11. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-93 en los ratones BALB/c.

Cuadro 12. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-147 en los ratones BALB/c.

Cuadro 13. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-VLPM en los ratones CD-1.

Cuadro 14. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-93 en los ratones CD-1.

Cuadro 15. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-147 en los ratones CD-1.

Cuadro 16. Dosis letal 50% calculada por cada línea de ratón y cepa viral empleada.

Cuadro 17. Órganos de ratones CD-1 inoculados con la cepa RVP-VLPM de los cuales se logró aislamiento viral.

Cuadro 18. Carga viral (ARN del RVP) registrada en diferentes órganos de ratones CD-1 inoculados con la cepa RVP-VLPM.

Cuadro 19. Promedio del título de anticuerpos registrados en ratones de los diferentes grupos experimentales (log2).

Cuadro 20. Promedio de la densidad óptica registrada en la prueba de ELISA empleando sueros de ratones de los diferentes grupos experimentales.

III. Lista de Figuras.

Figura 1. Representación esquemática de la estructura del virión.

Figura 2. Distribución de la enfermedad del ojo azul en México.

Figura 3. Comportamiento de la virulencia de RVP-VLPM en ratones BALB/c.

Figura 4. Supervivencia de ratones BALB/c inoculados con RVP-VLPM.

Figura 5. Comportamiento de la virulencia de RVP-93 en ratones BALB/c.

Figura 6. Supervivencia de ratones BALB/c inoculados con RVP-93.

Figura 7. Comportamiento de RVP-147 en ratones BALB/c.

Figura 8. Supervivencia de ratones BALB/c inoculados con RVP-147.

Figura 9. Comportamiento de la virulencia de RVP-VLPM en ratones CD-1.

Figura. 10. Supervivencia de ratones CD-1 inoculados con RVP-VLPM.

Figura 11. Comportamiento de la virulencia de RVP-93 en ratones CD-1.

Figura 12. Supervivencia de ratones CD-1 inoculados con RVP-93

Figura 13. Comportamiento de la virulencia de RVP-147 en ratones CD-1

Figura 14. Supervivencia de ratones CD-1 inoculados con RVP-147

Figura 15. Imágenes histológicas de cerebelos de ratones CD-1 inoculados con RVP-VLPM.

Figura 16. Imágenes histológicas de pulmones de ratones CD-1 inoculados con RVP-VLPM.

Figura 17. Imágenes histológicas de cerebelos de ratones BALB/c inoculados con RVP-VLPM.

Figura 18. Imágenes histológicas de pulmones de ratones BALB/c inoculados con RVP-VLPM.

IV. Lista de cuadros en anexo.

Cuadro 1. Datos empleados para calcular la $DL_{50\%}$ del RVP-93 en ratones BALB/c.

Cuadro 2. Datos empleados para calcular la $DL_{50\%}$ del RVP-93 en ratones CD-1.

Cuadro 3. Datos empleados para calcular la $DL_{50\%}$ del RVP-147 en ratones CD-1.

Cuadro 4. Datos empleados para calcular la $DL_{50\%}$ del RVP-VLPM en ratones CD-1.

V. Lista de figuras en anexo.

Figura 1. Porcentaje de efecto total (acumulativo) por logaritmo de dilución en BALB/c con RVP-93.

Figura 2. Porcentaje de efecto total (acumulativo) por Logaritmo de dilución CD-1 con RVP-93.

Figura 3. Porcentaje de efecto total (acumulativo) por Logaritmo de dilución CD-1 con RVP-147.

Figura 4. Porcentaje de efecto total (acumulativo) por Logaritmo de dilución CD-1 con RVP-VLPM.

1. Resumen

El *Rubulavirus porcino* (RVP) es el agente etiológico de una enfermedad viral endémica y exclusiva de México, la enfermedad del ojo azul (EOA). La EOA afecta a las unidades de producción porcina ubicadas principalmente en la zona centro y centro-occidente. Desde el primer reporte en la década de 1980 hasta la actualidad, el virus de la enfermedad del ojo azul ha sido analizado a nivel experimental principalmente en cerdos, y pocos estudios han sido realizados en especies heterólogas como ratones, ratas, gatos y murciélagos. El impacto de *Rubulavirus porcino* en la sociedad mexicana es económico ya que no es una enfermedad zoonótica, sin embargo, limita el comercio al prohibirse la exportación de cerdos de las zonas afectadas. Las necesidades de los porcicultores para la erradicación de esta enfermedad a nivel práctico, no han sido cubiertas en su totalidad. El objetivo de este trabajo fue optimizar los resultados a nivel experimental *in vivo* mediante el uso de ratones de laboratorio que permitan el estudio de la virulencia de las diferentes cepas de *Rubulavirus porcino*, evaluando los cambios histológicos en posibles órganos diana y comprobar la infección mediante pruebas diagnósticas de laboratorio como inhibición de la hemoaglutinación, ensayo ligado a enzimas inmunoabsorbentes, aislamiento viral *in vitro* y reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa en tiempo real (qRT-PCR), agilizando el estudio del RVP mediante el uso de ratones de laboratorio e indagando sobre sus rutas de infección en campo. Mediante una infección experimental empleando dos líneas de ratones de laboratorio (BALB/c y CD-1), se analizó la susceptibilidad y virulencia de tres cepas de RVP (RVP-VLPM, RVP-93 y RVP-147). Se inoculó por vía intracraneal a cada grupo de ratones con edad entre los 26 a 28 días, una cepa diferente de RVP. Se realizó el seguimiento clínico, la evaluación de la respuesta serológica, carga viral y daño histológico. Se registró susceptibilidad de las dos líneas de ratones a la infección con RVP. La dosis letal fue calculada más eficientemente en la línea de ratones CD-1, observando que los daños histológicos se presentaron en órganos como cerebelo y pulmón. El aislamiento viral en encéfalo y cerebelo permitió establecer la presencia del RVP con capacidad infectante en órganos de ratón. La carga viral del RVP, evaluada a través de qRT-PCR indica que los órganos blanco son del sistema nervioso y respiratorio, preferentemente. La seroconversión en animales convalecientes demuestra que la infección del RVP fue productiva y existió adaptación al sistema hospedero. Con los resultados obtenidos, se establece que el ratón de

laboratorio puede ser un efectivo modelo de estudio para entender los mecanismos de patogenia y virulencia del RVP.

Abstract

The *Porcine rubulavirus* (PorPV) is the etiologic agent of an exclusive and endemic disease of Mexico, the blue eye disease (BED). The BED affect the porcine units' production located on the central and western-central regions of the country. Since the first outbreak in 1980 up to now, the blue eye disease has been analyzed at experimental level mostly on pigs, and few studies has been realized on heterologous species like mices, rats, cats or bats. The impact of *Porcine rubulavirus* on the Mexican society is economic because is not a zoonotic disease, however it restricts the foreign trade for the affected zone. The needed of the porcine farmers for the eradication of this disease has not been covered on the totality. The aim of this study is developed the results at experimental level *in vivo* by the use of laboratory mices that permit the study of the virulence of the different *Porcine rubulavirus* strains, evaluating the histologic changes on the possibly target organs and check the infection by means of laboratory diagnosis test like inhibition of the hemmaglutination, enzyme-linked immunoabsorbent assay, virus isolation *in vitro* and polymerase chain reaction by reverse transcriptase on real time (qRT-PCR), speeding up the study of BED by the use of laboratory mices and inquire into over the infection routes on field. Through an experimental infection using two lines of laboratory mices (BALB/c and CD-1) it was analyzed the susceptibility and virulence of three strains of PorPV (RVP-VLPM, RVP-93 and RVP-147). It was inoculated by the intracranial way to each group a different strain of PorPV. It was accomplished the clinic following, the serologic answer it was evaluating, the viral load and histologic damage. It was registered the susceptibility of the two mices lines at the PorPV infection. The lethal doses were calculated more effectively on CD-1 mices, observing that the histologic damage was present on organs like brains and lungs. The viral isolation on brain and cerebellum was permit to establish the presence of PorPV with the capacity to infect mice organs. The viral load of PorPV was productive and it was existed the adaptation of the host system. With the results obtained is established that the laboratory mice can be an effective study model for understand the pathogenicity mechanism and virulence of PorPV.

2. Introducción

2.1. Antecedentes de la enfermedad

A principios de la década de 1980, se reportó el brote de una nueva enfermedad en cerdos, en ese entonces denominada “enfermedad de cerdos zarcos”, en la Piedad Michoacán (Martínez *et al.*, 1987). En el mes de mayo de ese año, se observó en el mismo municipio, un brote que duró nueve semanas con cuadros clínicos de encefalitis en lechones de cuatro a 10 días de edad. La morbilidad fue del 20% y la mortalidad del 90%, resultando letal en lechones, entre los dos y siete días después de la aparición de los primeros signos. Los signos reportados fueron: incoordinación, temblores musculares, postración, movimientos de carrera y opacidad de la córnea unilateral o bilateral; además de ataxia y conjuntivitis. Los cambios macroscópicos a la necropsia fueron: neumonía en lóbulos apicales y cardiacos, conjuntivitis y opacidad de la córnea, solamente observados en algunos lechones. Las lesiones microscópicas correspondieron a meningoencefalitis no supurativa y neumonía intersticial (Stephano *et al.*, 1981). El aislamiento del agente se realizó a partir de muestras del cerebro de lechones lactantes, provenientes de La Piedad Michoacán, mismos que presentaron desordenes de tipo nervioso y respiratorio, acompañado de opacidad de la córnea. En 1984 se identificó al agente causal como un virus hemoaglutinante, el cual fue clasificado dentro de la familia *Paramyxoviridae*, denominado virus de La Piedad Michoacán (Moreno-López *et al.*, 1986; Martínez *et al.*, 2006). Se han empleado pruebas rápidas de detección de virus y anticuerpos para estudiar al *Rubulavirus porcino*, como las pruebas de hemaglutinación (HA), inhibición de la hemoaglutinación (IHA), seroneutralización (SN), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo inmunoenzimático (ELISA) (McNeilly *et al.*, 1997). El Comité Internacional de Taxonomía Viral ha designado la abreviatura PorPV, por su nombre en inglés (*Porcine rubulavirus*), a nivel internacional. La cepa de referencia, de la Piedad Michoacán se conoce como: “PorPV-VLPM” (ICTV Taxonomy History, 2015). En México, la abreviatura más usada es RVP, de *Rubulavirus porcino*. El RVP comparte familia con otros paramixovirus como: virus parainfluenza humana tipo 2 y 4, virus de Mapuera, virus de las paperas (parotiditis), virus parainfluenza 5 y virus del simio 41.

En 2004, se realizaron estudios para estimar la prevalencia de RVP, reportando en promedio un 8%; los estados más afectados fueron: Michoacán, Campeche, Colima, Guanajuato, Quintana Roo y Zacatecas con prevalencias del 20 al 30%, mientras que Jalisco, Estado de México y Sonora tuvieron prevalencias del 10 al 19% (Morilla *et al.*, 2002). El RVP es el agente causal de la enfermedad de ojo azul (EOA), contemplada en la NOM-027-ZOO-1995 para la regulación del proceso zosanitario del semen de animales domésticos, con la finalidad de prevenir su diseminación en unidades de producción porcinas libres del virus. El RVP se encuentra distribuido en algunas regiones de los estados del centro y occidente de México como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Identificación de *Rubulavirus porcino* en diferentes estados de México

Estado	Granjas	Total de muestras	Granjas positivas	Granjas negativas
Querétaro	10	63	4	6
Guanajuato	8	46	3	5
Michoacán	2	7	2	0
Puebla	3	10	0	3
Veracruz	1	3	0	1

(Fuente: Martínez *et al.*, 2015).

2.2. Importancia de la enfermedad del ojo azul (EOA)

La EOA, es una de las enfermedades virales que afecta actualmente la porcicultura nacional. Los animales con la EOA, presentan retraso en el crecimiento, aumento de la mortalidad en lechones menores de 30 días, disminución de la fertilidad en hembras destinadas a la reproducción y baja calidad espermática en verracos, con las respectivas pérdidas económicas que conlleva (Martínez *et al.*, 2006). A continuación, se muestra en el Cuadro 2, las principales enfermedades de los porcinos de origen viral, bacteriano y parasitario de importancia económica en México.

Cuadro 2. Principales enfermedades infecciosas que afectan a los cerdos en México

Sistema afectado.	Enfermedades
Respiratorio	Pleuroneumonía, Pasteurelosis, neumonía enzoótica, rinitis atrófica, influenza, síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), salmonelosis y la enfermedad del ojo azul (EOA).
Digestivo en lechones de maternidad	Colibacilosis, gastroenteritis transmisible (GET), coccidiosis, rotavirus, clostridiosis y diarrea epidémica porcina (DEP).
Digestivo en cerdos de engorda	Salmonelosis, disentería, enteropatía proliferativa porcina (ileitis).
Reproductivo	Leptospirosis, parvovirus, cistitis-pielonefritis, PRRS y EOA.
Nervioso	EOA, estreptococosis y enfermedad del edema.
Septicémico	Salmonelosis y erisipela.

(Fuente, modificado de: Morilla, 2003).

2.3. Características del *Rubulavirus porcino*

El *Rubulavirus porcino* (RVP) pertenece al orden de los *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus*. El RVP es un virus envuelto, pleomórfico (de apariencia variable), de aproximadamente 180 a 300 nm de diámetro (Figura 1). Su genoma está conformado por una cadena de ARN en sentido negativo, por lo que requiere una ARN polimerasa para la transcripción del ARN en sentido positivo. El ciclo de replicación viral inicia con el reconocimiento y adsorción de la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN), con el receptor celular ácido neuramínico (NeuAc α 2, 3Ga) presente en la membrana celular, posteriormente un cambio en la conformación de la proteína HN permite la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y la penetración del genoma viral al citoplasma de la célula hospedadora. Las proteínas glicosiladas HN y F son traducidas en el retículo endoplásmico y modificadas en el aparato de Golgi, mientras que las proteínas NP, P y L se acoplan a un genoma viral ARN recién replicado. Finalmente, las proteínas son exportadas a la membrana citoplasmática para el ensamblaje del virión y su liberación por exocitosis (Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Santos-López *et al.*, 2004).

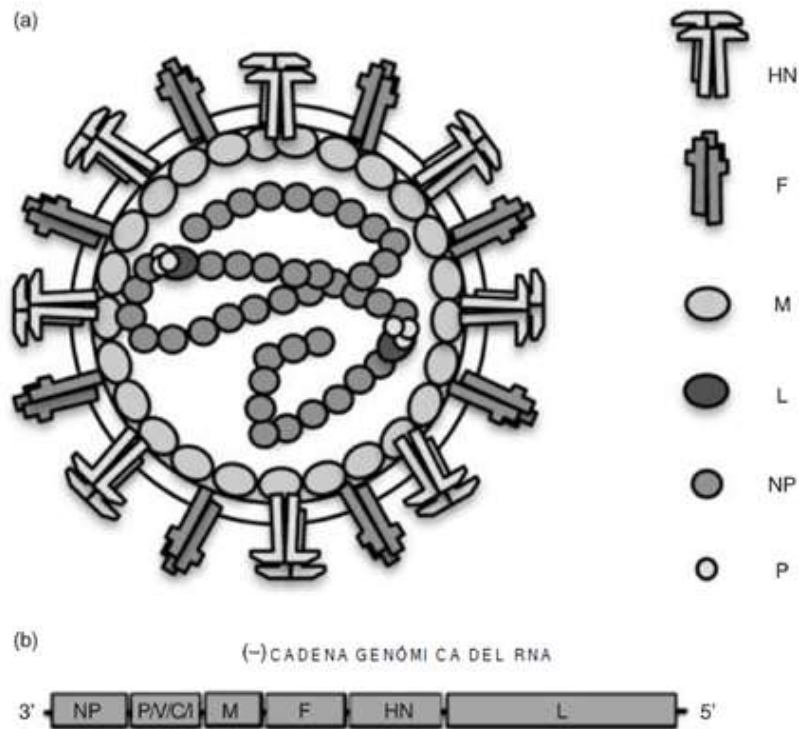


Figura 1. (a) Representación esquemática de la estructura del RVP. (b) Organización genética del RVP presentado bajo la partícula viral. (Fuente modificado de: Cuevas-Romero *et al.*, 2015).

Las proteínas estructurales, reguladoras y enzimáticas del RVP incluyen a la hemaglutinina-neuraminidasa (HN), de fusión de membranas (F), matriz (M), nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P) y una proteína de alto peso molecular (L) (Sundqvist *et al.*, 1990). Estas proteínas le confieren al RVP la capacidad de realizar las funciones necesarias en el proceso de infección, replicación y evasión de la respuesta inmune (Sundqvist *et al.*, 1990). Otras proteínas virales como V y C (provenientes del gen P), las cuales también son codificadas por el gen de la fosfoproteína, realizan la función de inhibir el complejo de la polimerasa viral y la cascada de señalización del interferón γ (Santos-López *et al.*, 2004). Se han reportado variaciones en la expresión de la proteína V y la no expresión de la proteína C, que pudiera estar asociado a modificaciones en la virulencia de los RVP, particularmente en lugares donde la enfermedad se considera endémica. Estas modificaciones pueden estar relacionadas con la atenuación natural de algunas cepas (Rivera-Benítez *et al.*, 2014).

2.4. Patogenia

El RVP ingresa al hospedero principalmente por vía aérea, uniéndose al receptor de ácido neuramínico α -2,3 galactosa (Mendoza-Magaña *et al.*, 2007), el cual se encuentra en diferentes concentraciones en el organismo de los cerdos, acorde a los estadios del desarrollo, como se observa en el Cuadro 3 (Reyes-Leyva *et al.*, 2002). Posteriormente, el virus se replica de forma primaria en tonsila, mucosa faríngea y/o alveolos, después de la primera replicación, ingresa a torrente sanguíneo y produce una viremia intermitente. La infección genera daño neurológico y problemas respiratorios en lechones menores a 30 días; las afecciones son del tipo respiratorio en lechones mayores a 30 días y reproductivo en cerdos adultos. Los estudios experimentales de la enfermedad demostraron que los cerdos de todas las edades son susceptibles, manifestando signos clínicos como fiebre, depresión, anorexia, problemas respiratorios, nerviosos, orquitis o atrofia testicular, epididimitis, falla reproductiva en hembras y opacidad corneal; incluida la raza pelón mexicano, reconocida por características de resistencia y adaptabilidad mayores que la de los cerdos de razas mejoradas en México (Ramírez *et al.*, 1999). Algunas de estas proteínas logran ser reconocidas por el sistema inmunológico y generan una respuesta, primero del tipo Th1 y en cerdos reincidentes, se genera una respuesta Th2 (Hernández *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Identificación del ácido neuramínico α -2,3 Galactosa y antígeno viral en órganos porcinos*.

	Neonatos		Adultos	
	Detección		Detección	
	RVP	NeuAc α 2,3Gal	RVP	NeuAc α 2,3Gal
Sistema Nervioso Central				
Bulbo olfatorio	+++	3	-	0
Corteza lóbulo piriforme	+++	3	-	0
Corteza cerebral	+	3	-	2
Hipocampo	++	2	-	2
Tálamo	++	3	-	1
Tallo cerebral	+++	1	-	1
Cerebelo	++	2	-	1
Sistema respiratorio				
Mucosa nasal	+++	3	++	3
Tráquea	++	2	++	2
Bronquios	+++	2	+++	2
Pulmón	+++	3	+++	3
Aparato reproductor				
Testículos	-	2	++	3
Epidídimo	-	1	+++	3
Sistema linfático				
Amígdalas	+++	3	++	3
Nódulos linfáticos	+	1	+++	3

*La histoquímica en cortes de tejidos porcinos fue realizada utilizando lectinas conjugadas a biotina y técnicas de amplificación con biotinil-tiramida. La unión de las lectinas fue evaluada de la siguiente manera: 0, ausente; 1, baja reacción observada en células dispersas; 2, mediana reacción, presente en menos de la mitad del corte histológico y 3, alta intensidad. En la identificación del antígeno (RVP): +, indica raramente encontrado; ++, regularmente encontrado; +++, encontrado frecuentemente y en abundancia. (Fuente: modificado Reyes Leyva *et al.*, 2002).

2.5. Epidemiología

Desde el primer brote la EOA, se diseminó en la zona centro del pacífico y bajo de México, principalmente en los estados de Michoacán, Jalisco y Guanajuato, como se observa en la Figura 2 (Morilla *et al.*, 2002).



Figura 2. Distribución de la enfermedad del ojo azul en México. La zona sombreada indica el área de infección endémica del *Rubulavirus porcino* (Fuente modificado de: Cuevas-Romero *et al.* 2015)

3. Marco teórico.

3.1. Investigación del virus de ojo azul en especies heterólogas

En la actualidad, existen pocos reportes de infecciones de RVP en especies heterólogas; en 1981, se detectaron títulos de anticuerpos 1:20, en ratas capturadas de Coacalco, México, observando una seroprevalencia del 11% (Rosales, *et al.*, 1987). En la misma década, se replicó el cuadro clínico en ratones adultos inoculados con RVP-VLPM por vía intracraneal, la mortalidad se presentó durante los tres a cinco días posteriores a la inoculación. El reaislamiento en células PK-15 se llevó a cabo a partir de muestras de cerebro, pulmón, hígado y bazo, presentando mayor tropismo en órganos del sistema nervioso central y tracto respiratorio (Correa *et al.*, 1986). Stephano *et al.* (1981), inocularon 18 ratones de aproximadamente seis semanas de edad, los cuales manifestaron un cuadro clínico en el que se observó postración con respiración abdominal, exudado nasal seroso escaso, arqueamiento del dorso, pelo hirsuto, incoordinación a la marcha y parálisis de los miembros anteriores,

presentándose la muerte a las 48 hrs post inoculación, recuperando la salud 11 ratones al término de la observación de 8 días que duró el experimento (Stephano *et al.*, 1985). En felinos, especie utilizada en granjas como método de control de roedores, se observó que el RVP-VLPM no genera daños patológicos o infecciones, asociado principalmente a la alta especificidad por especie (Arellanes *et al.*, 1994). En ratas de la cepa Wistar se evaluaron títulos de anticuerpos, respuesta celular, viremia, concluyendo que el RVP no genera cuadros patológicos (Cuetero *et al.*, 1995). En murciélagos, se ha detectado la presencia de anticuerpos (Salas-Rojas *et al.*, 2004), y pruebas moleculares para RVP en esta especie, sugiere la presencia del ARN en especies distintas al cerdo (Rivera-Benítez *et al.*, 2014).

3.2. Investigaciones de algunas enfermedades en ratones

Las líneas isogénicas de ratones han sido ampliamente utilizadas en la investigación científica, principalmente en el desarrollo y evaluación de vacunas (Alberti *et al.*, 1999), la oncología y estudios patológicos de diferentes enfermedades de animales y humanos (Maschi *et al.*, 2011), encontrando también que existen diferencias en las respuestas frente a los estímulos entre diferentes líneas de murinos (Lang *et al.*, 2016). Se ha estudiado el Metapneumovirus aviar subgrupo C virus, en ratones de la línea BALB/c, encontrando que el virus se logra replicar y persistir en pulmones, causando peribronquiolitis, perivascularitis, neumonía intersticial y alveolitis (Wei *et al.*, 2014). Enfermedades de cerdos han sido investigadas en ratones BALB/c; por ejemplo: el virus de la influenza porcina, donde se replicó el cuadro clínico y se cuantificó la letalidad de las cepas H1N2, H3N2 y H1N1, encontrando que la cepa H1N2 era la más patógena (Martín del Burgo *et al.*, 2009). Otros virus de cerdos que ha sido estudiados son, el Circovirus porcino tipo 1 y 2 (PCV1 y PCV2) inoculado vía intraperitoneal a 50 ratones de la línea ICR-CD-1, los resultados que obtuvieron fue que el PCV no causó enfermedad ni lesiones en tejidos durante el periodo experimental y sólo un ratón presentó seroconversión a los 20 días posterior a la infección (Quintana *et al.*, 2002).

3.3. Justificación de la experimentación del virus de ojo azul en ratones

Desde la década de 1980, en que se reportó el *Rubulavirus porcino* por primera vez y hasta la actualidad, los estudios han sido enfocados a la caracterización genética de aislamientos

recientes del RVP, de acuerdo a sus propiedades físico-químicas, comportamiento *in vitro* y características antigénicas, con la finalidad de actualizar los métodos para el diagnóstico y la elaboración de biológicos que contribuyan a la prevención y el control de la enfermedad. La mayoría de los estudios *in vivo* han sido realizados en cerdos lo cual resulta costoso, algunos en embrión de pollo, pero presenta el inconveniente de la observación de cuadros clínicos incomparables a los producidos en la especie blanco (cerdo). Sin embargo, no se han realizado estudios minuciosos de infecciones experimentales del RVP en ratones, evaluando la susceptibilidad a la infección, reproducibilidad de cuadros clínicos similares a los presentados en cerdos, virulencia, seroconversión, lesiones histopatológicas y carga viral en órganos.

El modelo murino ha sido de gran utilidad para el estudio de otras enfermedades, otorgando resultados equiparables a los reproducidos en humanos y otras especies. Algunas de las ventajas que presenta el empleo de ratones se mencionan a continuación:

- Corto ciclo reproductivo
- Vida útil acelerada (1 año de ratón = ~30 años en humanos) (Flurkey *et al.*, 2007)
- Tamaño reducido
- Número de animales apropiado por camada
- Crianza en cautiverio
- Gran docilidad, conseguida tras su largo tiempo de domesticación

El receptor de ácido neuramínico α -2,3 galactosa (Neu5Ac- α -2-3 Gal) al que se une el *Rubulavirus porcino* está presente en ratones, en diferentes concentraciones dependiendo de los estadios del desarrollo (neonato, adulto y senil), manteniéndose constantes en hipocampo, bulbo olfatorio y corteza, la expresión del receptor disminuye en el cerebelo conforme avanza la edad en los ratones (Rinflerch *et al.*, 2012).

4. Objetivos

4.1. General

Evaluar la virulencia de tres cepas de *Rubulavirus porcino* en ratones CD-1 y BALB/c

4.2. Objetivos particulares

- Determinar la susceptibilidad de ratones de líneas genéticamente estandarizadas frente a la infección experimental con el *Rubulavirus porcino*
- Determinar la dosis letal 50% de las cepas de *Rubulavirus porcino* en el modelo murino
- Analizar los cambios histológicos producidos por el *Rubulavirus porcino* en el modelo murino
- Cuantificar la carga viral (virus infeccioso y copias de ARN viral) del *Rubulavirus porcino* en diferentes órganos de los ratones inoculados
- Titular la respuesta inmune humoral generada contra el *Rubulavirus porcino* en ratones convalecientes

5. Hipótesis

La inoculación experimental del *Rubulavirus porcino*, en el modelo murino, podrá generar cuadros clínicos y lesiones comparables a las ocasionadas en cerdos.

6. Material y métodos

6.1. Cepas virales

Para la infección experimental se emplearon como inóculo dos cepas de *Rubulavirus porcino* (RVP) aisladas en 2013, denominadas RVP-93 (la cual es proveniente del estado de Querétaro) y RVP-147 (del estado de Michoacán); aunado a estos, se incluyó en el estudio la cepa de referencia aislada en Michoacán en 1984, RVP-VLPM. Cada una de las cepas fue replicada *in vitro* en células PK-15, posteriormente fueron tituladas mediante el método de Spermann-Karber en placas de 96 pozos.

6.2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones destetados de la línea endogámica BALB/c y exogámica CD-1 de 21 días de edad con un peso promedio de 18g. Los ratones se mantuvieron en cámaras de aislamiento en grupos de 5 ratones cada uno. Los experimentos fueron realizados con un intervalo de dos semanas entre cada cepa empleada para realizar la completa desinfección y reacondicionamiento del área. Todos los animales recibieron alimentación y agua a libre acceso. Los ratones se inspeccionaron dos veces por día, recabando información general de su estado de salud mediante la observación de la actitud y la postura. Los cuidados de los ratones se realizaron de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.3. Diseño experimental

6.3.1. Evaluación de la virulencia de tres cepas de *Rubulavirus porcino* en ratones BALB/c y CD-1

Para determinar la susceptibilidad de los ratones frente a la inoculación experimental con las diferentes cepas del *Rubulavirus porcino* (RVP), se emplearon seis grupos de cinco ratones cada uno. Se inoculó por vía intracraneal 0.03 ml del RVP conteniendo 1×10^6 DICC_{50%}/ml. Cada grupo contó con un número similar de ratones inoculados con solución salina, mismos que fueron empleados como testigos durante el proceso de experimentación. El diseño experimental se presenta en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Diseño experimental para determinar la susceptibilidad de los ratones BALB/c y CD-1 frente a la infección con RVP

Línea de ratón/cepa viral	RVP-VLPM (n)	Testigos (n)	RVP-93 (n)	Testigos (n)	RVP-147 (n)	Testigos (n)
BALB/c	5	5	5	5	5	5
CD-1	5	5	5	5	5	5

6.3.2. Determinación de la dosis letal en ratones BALB/c y CD-1 con cepas de RVP

La dosis letal en ratón se calculó realizando diluciones decuples logarítmicas del inóculo original, mismo que contenía 1×10^6 DICC_{50%}/ml. Cada cepa viral fue diluida cinco veces (desde 10^6 hasta 10^2), se inoculó por vía intracraneal un volumen de 0.03 ml de cada dilución del virus. El diseño experimental se presenta en el Cuadro 5. La duración del experimento fue de 22 días posterior a la inoculación experimental, los ratones sobrevivientes fueron sometidos a eutanasia para colectar el suero que posteriormente sería empleado en las pruebas serológicas.

Cuadro 5. Diseño experimental para determinar la dosis letal en ratones BALB/c y CD-1 empleando diferentes cepas del RVP

Grupo y cepa viral/línea de ratón	BALB/c	CD-1
RVP-VLPM		
10^6	5	5
10^5	5	5
10^4	5	5
10^3	5	5
10^2	5	5
RVP-93		
10^6	5	5
10^5	5	5
10^4	5	5
10^3	5	5
10^2	5	5
RVP-147		
10^6	5	5
10^5	5	5
10^4	5	5
10^3	5	5
10^2	5	5

6.4. Evaluación histológica de órganos de ratones inoculados experimentalmente con el RVP

Para realizar la evaluación histológica se seleccionaron ratones que presentaron signos agudos de la enfermedad y ratones del grupo testigo. La relación de los ratones analizados se presenta en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Identificación de los ratones empleados para la evaluación histológica posterior a la infección experimental con el RVP

	Testigo*	RVP-VLPM 10 ⁶	RVP-VLPM 10 ⁵	RVP-VLPM 10 ⁴	RVP-VLPM 10 ³
BALB/c	1	1	1	1	1
CD-1	1	1	1	1	1

*Los ratones testigo BALB/c y CD-1, respectivamente, fueron los mismos testigos para sus subgrupos.

Brevemente, las muestras colectadas consistieron en tráquea, pulmón, corazón, hígado, bazo, páncreas, riñón, vejiga, cerebelo y cerebro. Se cortó aproximadamente 6 mm² de cada órgano y se sumergió en formol amortiguado al 10%. Se dejó fijar por 48 horas y posteriormente fue procesado por técnicas histológicas estandarizadas para su inclusión en parafina. Los órganos embebidos en parafina fueron empleados para realizar cortes en un micrótopo, con un grosor de 5µm, posteriormente fueron teñidos con hematoxilina y eosina. La evaluación del daño histológico ocasionado por la infección de RVP, se llevó a cabo en un microscopio modelo “Olympus BX50” en la Facultad de Medicina de la UNAM. Las lesiones fueron incorporadas a una base de datos y fotodocumentadas, utilizando el software Infinity analyze versión 6.3.0.

6.5. Cuantificación de la carga viral (virus infeccioso y ARN viral) del RVP en diferentes órganos de ratones inoculados

Para la cuantificación de la carga viral de RVP con capacidad infectante, se emplearon 17 muestras de encéfalo y cerebelo, estas muestras fueron colectadas de ratones CD-1 inoculados con la cepa RVP-VLPM. Se seleccionaron estos ratones ya que fueron los que presentaron mayor resistencia a la infección con esta cepa evaluada. La necropsia se realizó en un gabinete de bioseguridad, se extrajo el encéfalo y se pesaron 100 mg del órgano, se

agregaron nueve partes de medio EMEM sin suero (dilución final 1:10) y se realizaron macerados en morteros individuales, una vez que se obtuvieron adecuados homogeneizados, las soluciones se decantaron en microtubos, posteriormente se centrifugaron a 4,000 rpm/ 15 minutos a 4° C. Al llevarse a cabo la separación de la materia sólida con el sobrenadante, estos últimos fueron colectados y filtrados con una membrana de 0.22 µm y se almacenaron a -70°C, hasta su uso.

Para el aislamiento del RVP, se utilizó un volumen final de 1.0 ml, que consistió en una dilución de 0.10 ml de cada muestra de órganos procesada más 0.9 ml de MEM (dilución 1:10). La inoculación se llevó a cabo en placas de 96 pozos con monoestratos celulares de la línea comercial PK-15, que presentaban una confluencia del 70 al 80%. La adsorción se realizó por 40 minutos a una temperatura de 37° C, al finalizar este tiempo de incubación se agregó 4ml de MEM. Se observó el proceso de infección a las 24, 48 y 72 horas. Al finalizar el periodo de incubación se obtuvieron 0.05 ml de sobrenadante para determinar por la prueba de hemoaglutinación (HA), el título viral fue calculado en unidades hemoaglutinantes.

Para confirmar la presencia del ARN viral del RVP en los órganos de los ratones, la carga del ARN viral fue determinada mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR por sus siglas en inglés).

Se emplearon órganos de ratones CD-1 inoculados con la cepa RVP-VLPM, las muestras analizadas fueron colectadas de los ratones del grupo 10^6 a 10^3 . Los órganos procesados fueron: encéfalo, tráquea, pulmón, corazón, hígado, bazo, páncreas, riñón y vejiga

Los órganos fueron macerados con un agitador mecánico “Disruptor genie®” en microtubos preparados con arena estéril, zirconia de 0.5mm y 0.5 ml de búfer de lisis (RLT) del paquete comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen®), se prosiguió con el protocolo para la extracción de ARN de las muestra: centrifugando a 10,000 rpm por 10 minutos para recuperar el sobrenadante del macerado en microtubos de 2ml, se agregó 0.7 ml de etanol y se mezclaron por inversión en 10 ocasiones, se transfirió 0.7 ml de la suspensión a las columnas de sílica y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto, este procedimiento se realizó en dos ocasiones

para transferir todo el volumen de la suspensión. A la columna se agregó 0.7 ml de buffer RW1 y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Los lavados, se realizaron por duplicado con 0.5 ml de buffer RPE, siendo eliminado por centrifugación durante 1 a 2 minutos. Para eliminar los residuos de etanol, la columna fue colocada en un nuevo tubo colector y se centrifugó por 1 minuto adicional. La resuspensión del ARN total se llevó a cabo agregando 0.05 ml de agua libre de nucleasas colocado en el centro de la columna. Finalmente, las columnas fueron centrifugadas a máxima velocidad por 1min, el ARN total obtenido se almacenó a -70° C. Para la prueba de qRT-PCR en tiempo real, se emplearon 0.002ml de cada muestra de ARN, el procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Rivera-Benítez *et al.*, 2013.

Los componentes de la reacción fueron los siguientes: iniciadores y sonda para la detección de un fragmento del gen N, los iniciadores contienen la secuencia genérica para todos los genotipos de RVP reportados, que son: iniciador sentido.- PoRV-Nxp16-Fw 5' – GCG TCG AGA TTA ATG GCT TTG – 3' e iniciador reversa: PoRV-Nxp16-Rv 5' – AAC ATT GAG TGC ATT GAT GTT G – 3', y sonda PoRVNxp16- P, 5'-ATT CCA AAC GAC CGC GCC ATC C-3', marcada con 6-carboxifluoresceína (FAM) y el resto de la mezcla de reacción, activador, mix RNA (LightCycler), potenciador y agua libre de nucleasas (Rivera-Benítez *et al.*, 2013).

A continuación, en el Cuadro 7 se describe el protocolo de amplificación para el gen N del *Rubulavirus porcino*.

Cuadro 7. Protocolo de amplificación de qRT-PCR para la amplificación del gen N del RVP

Paso	Tiempo	Temperatura	Número de ciclos
Transcripción reversa	30min	50° C	1
Activación inicial de PCR	15min	95° C	1
Desnaturalización	0.5min	95° C	1
Alineamiento	0.5min (lectura de la señal)	60° C	40
Extensión	1min	72° C	
Extensión final	10min	72° C	1

6.6. Análisis serológico

La presencia de anticuerpos contra el RVP se analizó con dos pruebas serológicas, inhibición de la hemaglutinación (IHA) y ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Para la prueba de IHA, se trataron los sueros para eliminar la inespecificidad en las muestras, para ello se inactivaron a 56° C por 30 minutos. Posteriormente, se separaron alícuotas de 0.05 ml de suero junto con 0.2 ml de PBS, 0.05 ml de glóbulos rojos de ave y 0.5 miligramos (mg) de caolín, y se dejaron reposar por doce horas a 4° C. Una vez procesados los sueros, se centrifugaron y se obtuvieron los sobrenadantes. Al inicio de la prueba se colocaron 0.025 ml de PBS en todos los pozos, en la primer fila sobre cada columna se colocaron 0.025 ml de los sueros de ratón y se realizaron diluciones dobles seriadas, desde 1:10 hasta 1:1280; una vez realizado, se colocaron 0.025ml del virus de trabajo (ajustado a 8 UHA) y se dejaron incubar por media hora, por último se colocaron 0.05 ml de glóbulos rojos de ave (al 0.5%) y se incubaron por media hora para observar la hemaglutinación (HA, prueba para ajustar el virus de trabajo) e inhibición de la hemaglutinación; en todas las pruebas se incluyeron sueros de referencia positivos y negativos. La lectura de la dilución considerada como positiva fue transformada a logaritmo base dos (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1996).

El ensayo inmunoenzimático de elección fue indirecto, se prepararon las placas de acuerdo a lo reportado por Cuevas-Romero *et al.*, (2016). Como fase sólida, se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano, el antígeno con el que se sensibilizó la fase sólida fue una proteína recombinante HN del RVP (Cuevas-Romero *et al.*, 2016) en una dilución 1:750 del cual se colocaron 0.1 ml en cada pozo y se dejaron incubar por 24hrs; para los lavados en cada uno de los pasos de sensibilización, bloqueo, reacción antígeno-anticuerpo, reacción anticuerpo-anti anticuerpo y revelado, se empleó PBS *tween* al 0.05%, lavando en tres ocasiones con un volumen de 0.25 ml en cada pozo. El bloqueo (para impedir que otros antígenos específicos se unan a la proteína HN) fue realizado con albúmina (BSA) al 1% en PBS colocando 0.1 ml dejando incubar por una hora a 37° C. Se realizaron diluciones de los sueros 1:100 con PBS al 1% de albumina sérica bovina y *tween* al 0.05%. A cada pozo fue agregado 0.1 ml de la dilución de los sueros problema, la placa se incubó a 37° C por una hora, al término se realizaron los lavados correspondientes y se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de

ratón conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1:7500 por una hora a 37° C. Para el revelado se usó 0.1 ml TMB en cada uno de los pozos durante 10 a 15 minutos. Por último, se agregó 0.08 ml de solución de paro (ácido sulfúrico al 1M) en cada pozo. Las densidades ópticas fueron obtenidas en un espectrofotómetro a 450nm.

7. Resultados

7.1. Evaluación de la virulencia de tres cepas de *Rubulavirus porcino* en ratones BALB/c y CD-1

Con la finalidad de determinar la susceptibilidad de los ratones frente a la inoculación experimental con el *Rubulavirus porcino* (RVP), se emplearon seis grupos de cinco ratones cada uno inoculando por vía intracraneal con cada una de las cepas de RVP seleccionadas. Todos los grupos de ratones resultaron susceptibles a la inoculación. El grupo de ratones BALB/c, inoculados con la cepa RVP-147 y el grupo de ratones CD-1, inoculados con la cepa RVP-93 fueron los que presentaron un mayor porcentaje (80%) de ratones muertos en menor tiempo (4 días). En la mayoría de los grupos, los signos clínicos comenzaron a detectarse a partir del segundo día PI (Cuadro 8 y 9).

7.2. Determinación de la dosis letal en ratones BALB/c y CD-1 con cepas de RVP

Se lograron generar cuadros clínicos en los ratones inoculados por vía intracraneal, a partir del cuarto día posterior a la inoculación experimental con RVP en las líneas BALB/c y CD-1. El tiempo en que se generaron los cuadros clínicos fue inversamente proporcional a la cantidad de virus inoculado. Es decir, a mayor título viral se observó la presentación de cuadros nerviosos en menor tiempo. A continuación, se describen los signos clínicos observados (Cuadro 10), su comportamiento, la supervivencia y dosis letal en cada grupo experimental.

Cuadro 8. Porcentaje de mortalidad en diferentes grupos de ratones BALB/c inoculados con las cepas de RVP.

BALB/c	Cepa Viral	Ratones sanos	Ratones enfermos	Ratones muertos	% Mortalidad acumulado
DPI	RVP-VLPM				
0		5	0	0	0
1		5	0	0	0
2		4	1	0	0
3		2	2	1	20
4		2	0	2	60
5		1	0	1	80
6		1	0	0	80
7		0	0	1	100
	RVP-93				
0		5	0	0	0
1		5	0	0	0
2		5	0	0	0
3		3	1	1	20
4		2	0	2	60
5		1	0	1	80
6		0	1	0	80
7		0	0	1	100
	RVP-147				
0		5	0	0	0
1		5	0	0	0
2		4	1	0	0
3		0	2	3	60
4		1	0	1	80
5		0	1	0	80
6		0	1	0	80
7		0	0	1	100

Cuadro 9. Porcentaje de mortalidad en diferentes grupos de ratones CD-1 inoculados con las cepas de RVP.

CD-1	Cepa Viral	Ratones Sanos	Ratones Enfermos	Ratones Muertos	% Mortalidad acumulado
DPI	RVP-VLPM				
0		5	0	0	0
1		5	0	0	0
2		5	1	0	0
3		5	1	0	0
4		0	3	2	40
5		0	2	1	60
6		0	2	0	60
7		0	1	1	80
8		0	0	1	100
	RVP-93				
0		5	0	0	0
1		5	0	0	0
2		5	0	0	0
3		4	1	0	0
4		0	4	3	80
5		0	0	1	100
	RVP-147				
0		5	0	0	0
1		5	0	0	0
2		5	0	0	0
3		4	3	2	40
4		0	3	1	60
5		0	2	1	80
6		0	1	0	80
7		0	1	0	80
8		0	0	1	100

Cuadro 10. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-VLPM en los ratones BALB/c.

Signo registrado	Neurológico			Respiratorio			Sistémico			
	Identificación	Temblores	Postración	Parálisis*	Disnea	Taquipnea	Respiración superficial	Encorvamiento	Pelo hirsuto	Eutanasia/muerte
Grupo 1 x 10⁶ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	+++	++++	-	++++	++	++++	+++	++++		Muerte
Ratón No. 2	+++	++++	+	++++	++	++++	+++	+++		Muerte
Ratón No. 3	+++	++++	++	++++	+++	++++	++	++		Muerte
Ratón No. 4	+++	++++	-	++++	+++	++++	++	++		Muerte
Ratón No. 5	+++	++++	-	++++	+++	++++	+++	++		Muerte
Grupo 1 x 10⁵ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	+++	++	++++	+++	+++	++++	++		Muerte
Ratón No. 2	++++	+++	++	++++	+++	+++	++++	++		Muerte
Ratón No. 3	++++	+++	-	++++	+++	+++	++++	++		Eutanasia
Ratón No. 4	++++	+++	-	++++	+++	+++	+++	++		Eutanasia
Ratón No. 5	++++	+++	-	++++	+++	+++	+++	++		Eutanasia
Grupo 1 x 10⁴ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	++		Muerte
Ratón No. 2	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	++		Muerte
Ratón No. 3	++++	+++	++	++++	+++	+++	+++	+		Muerte
Ratón No. 4	++++	+++	-	++++	+++	+++	+++	+		Muerte
Ratón No. 5	++++	+++	-	++++	+++	+++	+++	+		Eutanasia
Grupo 1 x 10³ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	+++	++	++++	+++	+++	+++	+		Muerte
Ratón No. 2	++++	+++	-	++++	+++	+++	+++	+		Eutanasia
Ratón No. 3	++++	+++	++	++++	+++	+++	+++	+		Muerte
Ratón No. 4	++++	+++	++	++++	+++	+++	+++	+		Muerte
Ratón No. 5	++++	+++	-	++++	+++	+++	++	+		Muerte
Grupo 1 x 10² DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	++++	++	++++	+++	+++	++	+		Muerte
Ratón No. 2	++++	++++	-	++++	+++	+++	++	+		Eutanasia
Ratón No. 3	++++	++++	-	++++	+++	+++	++	+		Eutanasia
Ratón No. 4	++++	++++	-	++++	+++	+++	++	-		Eutanasia
Ratón No. 5	++++	++++	-	++++	+++	+++	+	-		Eutanasia

*Parálisis del tren anterior o posterior. -: nulo. +: leve. ++: moderado. +++: agudo. ++++: hiperagudo

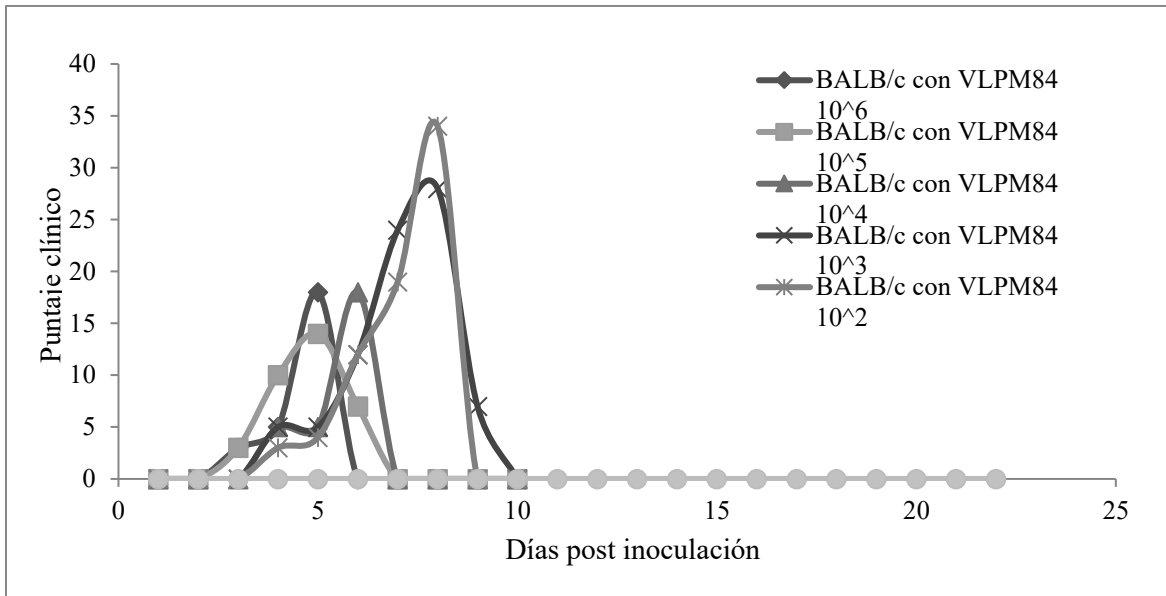


Figura 3. Comportamiento de la virulencia de RVP-VLPM en ratones BALB/c.

A partir del tercer día post inoculación (PI) fueron registrados signos clínicos en los ratones inoculados, (Figura 3). La supervivencia fue determinada hasta el día 9 PI (Figura 4).

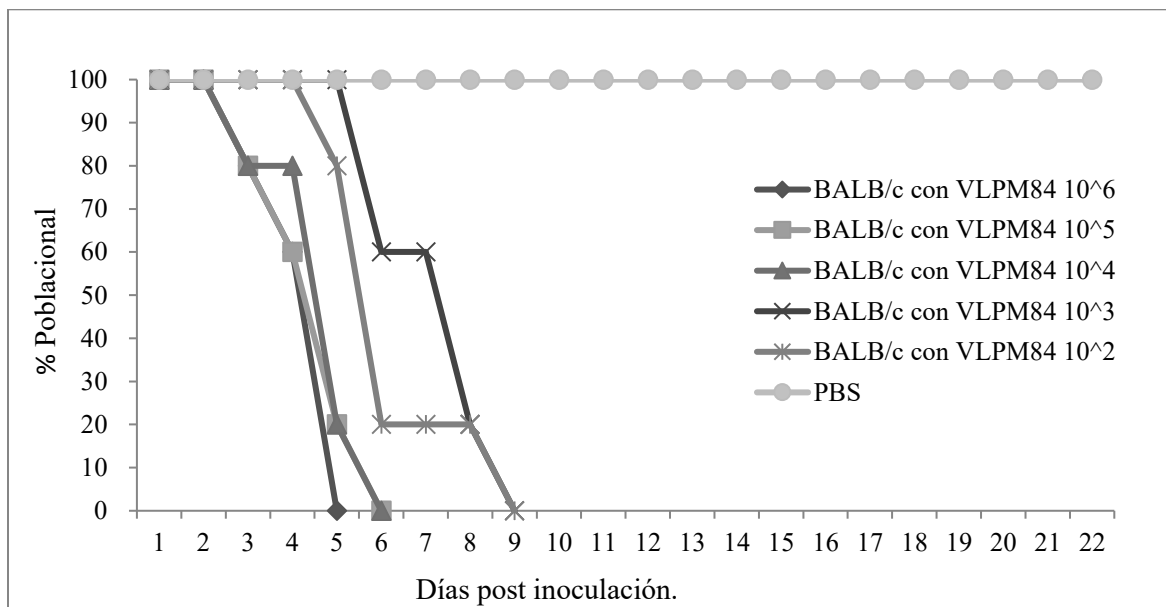


Figura 4. Supervivencia de ratones BALB/c inoculados con RVP-VLPM.

Cuadro 11. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-93 en los ratones BALB/c.

Signo registrado	Neurológico			Respiratorio			Sistémico			
	Identificación	Temblores	Postración	Parálisis*	Disnea	Taquipnea	Respiración superficial	Encorvamiento	Pelo hirsuto	Eutanasia/muerte
Grupo 1 x 10⁶ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++		Muerte
Ratón No. 2	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+++		Muerte
Ratón No. 3	++++	+++	++	+++	+++	++++	++++	+++		Muerte
Ratón No. 4	++++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++		Muerte
Ratón No. 5	++++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++		Muerte
Grupo 1 x 10⁵ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	+++	++	++++	+++	+++	+++	+		Muerte
Ratón No. 2	++++	+++	++	++++	+++	+++	+++	+		Muerte
Ratón No. 3	++++	+++	++	++++	++	++	+++	+		Muerte
Ratón No. 4	++++	+++	++	++++	++	++	+++	+		Muerte
Ratón No. 5	++++	+++	++	++++	++	++	+++	+		Muerte
Grupo 1 x 10⁴ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+		Muerte
Ratón No. 2	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+		Muerte
Ratón No. 3	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+		Muerte
Ratón No. 4	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+		Muerte
Ratón No.5	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+		Eutanasia
Grupo 1 x 10³ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	+++	++++	++	++++	++++	+++	++	++		Muerte
Ratón No. 2	+++	+++	++	++++	++++	+++	++	+		Muerte
Ratón No. 3	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	-		Eutanasia
Ratón No. 4	+++	++	+	+++	+++	+++	+	-		Eutanasia
Ratón No. 5	+++	++	+	+++	+++	+++	+	-		Eutanasia
Grupo 1 x 10² DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parálisis del tren anterior o posterior. -: nulo. +: leve. ++: moderado. +++: agudo. ++++: hiperagudo.

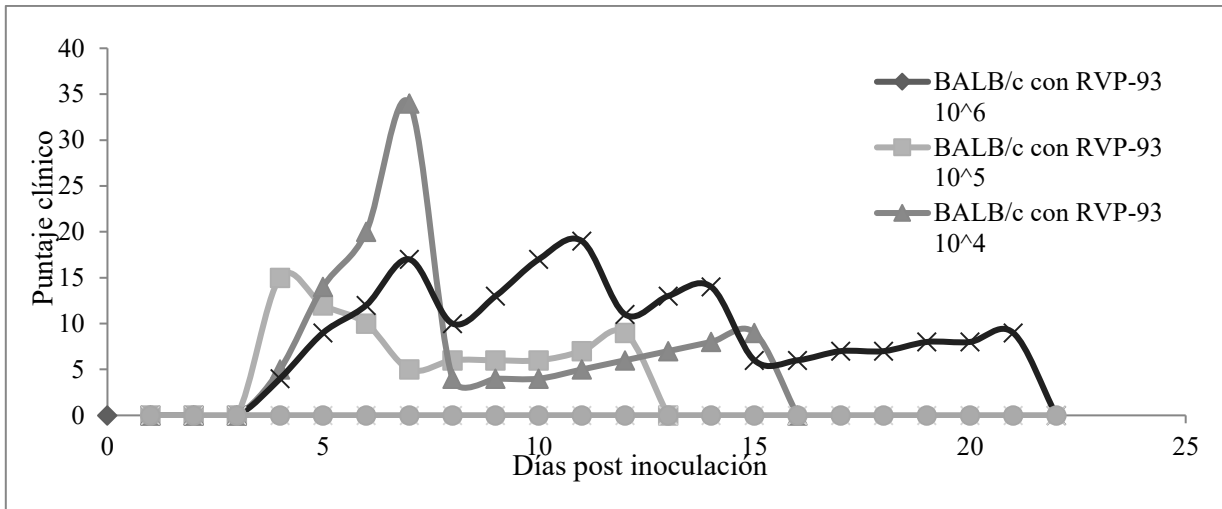


Figura 5. Comportamiento de la virulencia de RVP-93 en ratones BALB/c.

Al cuarto día PI se registraron los primeros signos clínicos (Cuadro 11) en los ratones BALB/c inoculados RVP-93 (Figura 5), la duración de los signos fue más prolongada que en los animales del experimento anterior, esto fue relacionado también a la supervivencia del grupo experimental, la cual fue más elevada (Figura 6).

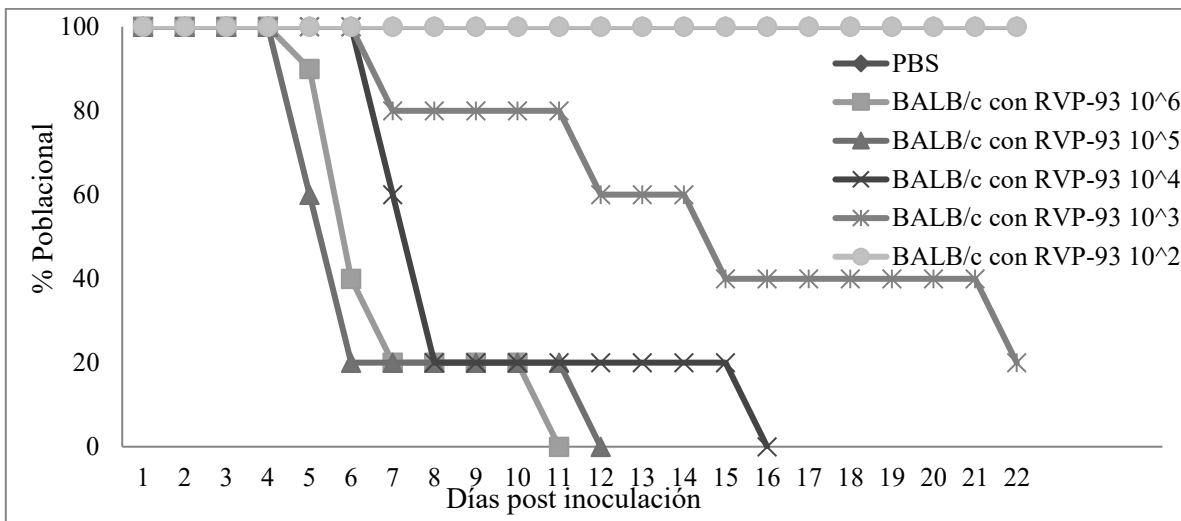


Figura 6. Supervivencia de ratones BALB/c inoculados con RVP-93.

En el grupo experimental BALB/c inoculados con la cepa RVP-147 los signos se registraron a partir del tercer día PI, manteniéndose la presencia de signos hasta los ocho días PI, fueron más evidentes signos clínicos nerviosos y respiratorios y la muerte se presentó de manera gradual de acuerdo a la concentración viral inoculada (Cuadro 12, Figuras 7 y 8).

Cuadro 12. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-147 en los ratones BALB/c.

Signo registrado	Neurológico			Respiratorio			Sistémico			
	Identificación	Temblores	Postración	Parálisis*	Disnea	Taquipnea	Respiración superficial	Encorvamiento	Pelo hirsuto	Eutanasia/muerte
Grupo 1 x 10⁶ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 2	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 3	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 4	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 5	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Grupo 1 x 10⁵ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 2	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 3	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 4	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 5	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Grupo 1 x 10⁴ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	-		Muerte
Ratón No. 2	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	-		Muerte
Ratón No. 3	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	-		Muerte
Ratón No. 4	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	-		Muerte
Ratón No. 5	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	-		Muerte
Grupo 1 x 10³ DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-		Muerte
Ratón No. 2	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-		Muerte
Ratón No. 3	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-		Muerte
Ratón No. 4	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-		Muerte
Ratón No. 5	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-		Muerte
Grupo 1 x 10² DICC_{50%}/ml										
Ratón No. 1	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 2	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 3	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 4	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte
Ratón No. 5	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	-		Muerte

*Parálisis del tren anterior o posterior. -: nulo. +: leve. ++: moderado. +++: agudo. ++++: hiperagudo

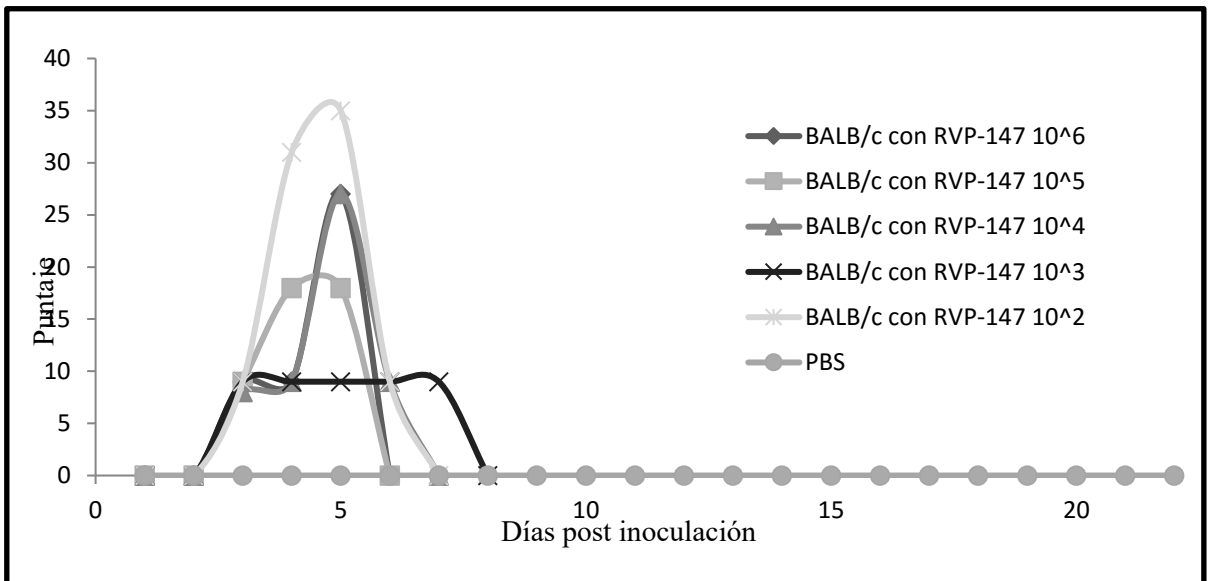


Figura 7. Comportamiento de RVP-147 en ratones BALB/c.

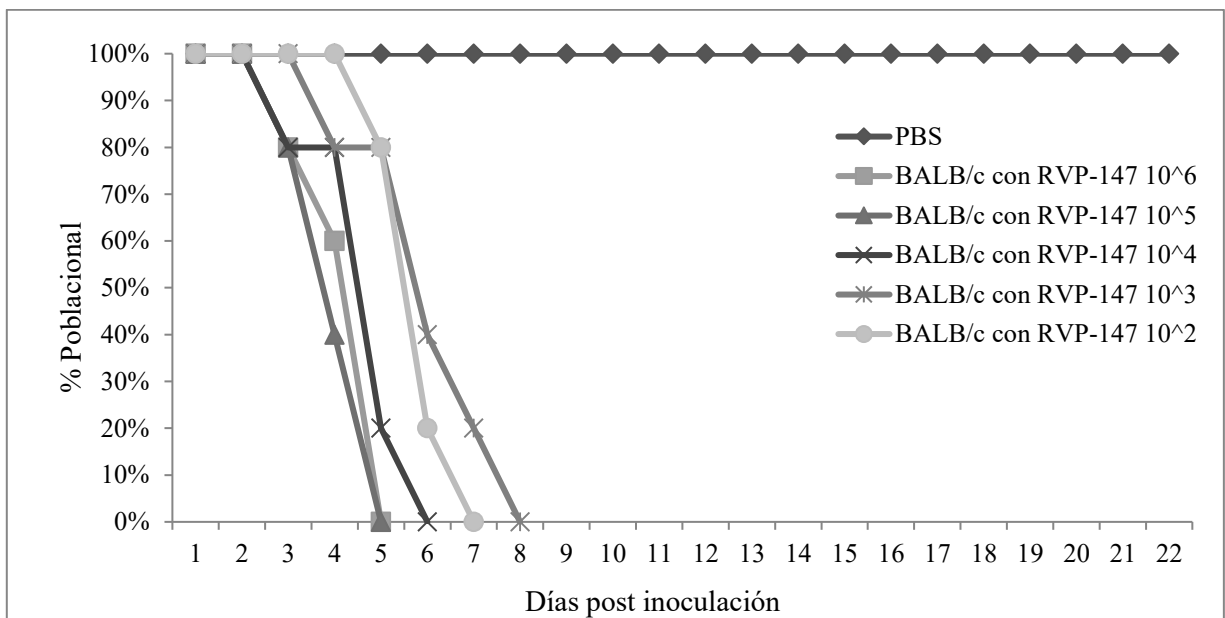


Figura 8. Supervivencia de ratones BALB/c inoculados con RVP-147.

Cuadro 13. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-VLPM en ratones CD-1.

Signo registrado	Neurológico			Respiratorio			Sistémico		
	Identificación	Temblores	Postración	Parálisis*	Disnea	Taquipnea	Respiración superficial	Encorvamiento	Pelo hirsuto
Grupo 1 x 10⁶ DICC_{50%}/ml									
Ratón No. 1	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++	Muerte
Ratón No. 2	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++	Muerte
Ratón No. 3	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	++	Muerte
Ratón No. 4	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	++	Muerte
Ratón No. 5	++++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	++	Muerte
Grupo 1 x 10⁵ DICC_{50%}/ml									
Ratón No. 1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	Muerte
Ratón No. 2	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	+	Muerte
Ratón No. 3	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+	Muerte
Ratón No. 4	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+	Eutanasia
Ratón No. 5	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+	Eutanasia
Grupo 1 x 10⁴ DICC_{50%}/ml									
Ratón No. 1	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++	+	Muerte
Ratón No. 2	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++	+	Muerte
Ratón No. 3	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++	+	Muerte
Ratón No. 4	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++	+	Muerte
Ratón No. 5	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++	+	Muerte
Grupo 1 x 10³ DICC_{50%}/ml									
Ratón No. 1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	Muerte
Ratón No. 2	+++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	+	Eutanasia
Ratón No. 3	+++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	+	Eutanasia
Ratón No. 4	+++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	+	Eutanasia
Ratón No. 5	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Grupo 1 x 10² DICC_{50%}/ml									
Ratón No. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parálisis del tren anterior o posterior. -: nulo. +: leve. ++: moderado. +++: agudo. ++++: hiperagudo

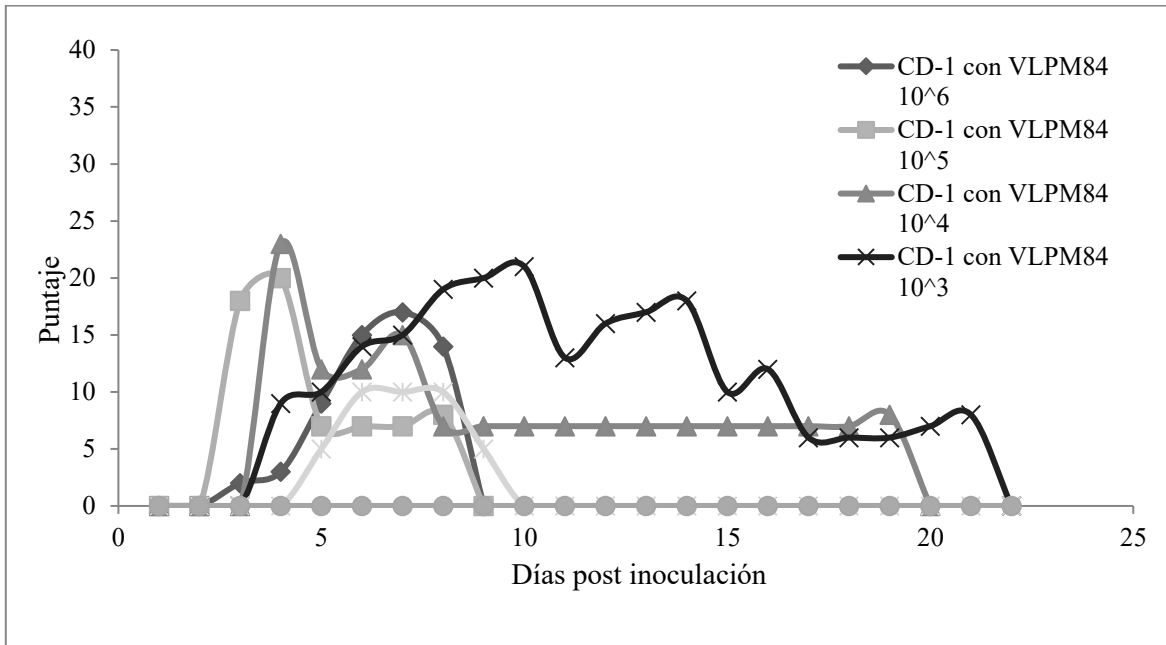


Figura 9. Comportamiento de la virulencia de RVP-VLPM en ratones CD-1.

A partir del tercer día PI los ratones CD-1 inoculados con la cepa RVP-VLPM, comenzaron a mostrar signos clínicos (Cuadro 13 y Figura 9). Los ratones control y los sobrevivientes a la inoculación del virus fueron monitoreados hasta el día 22 (Figura 10).

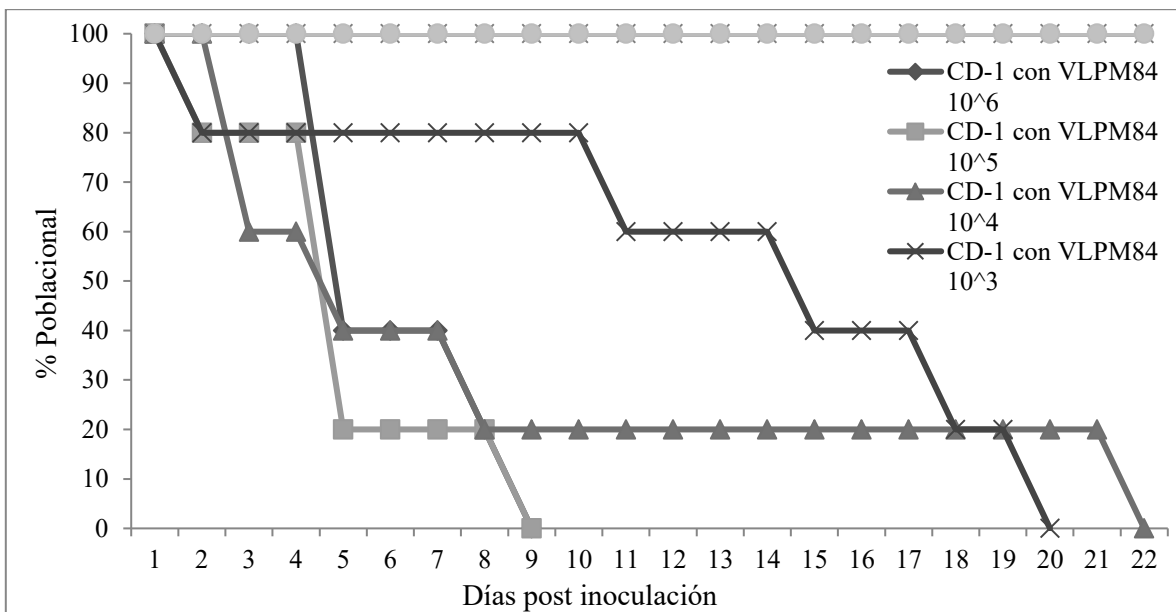


Figura. 10. Supervivencia de ratones CD-1 inoculados con RVP-VLPM.

Cuadro 14. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-93 en los ratones CD-1.

Signo registrado	Neurológico			Respiratorio			Sistémico		
	Temblores	Postración	Parálisis*	Disnea	Taquipnea	Respiración superficial	Encorvamiento	Pelo hirsuto	Eutanasia/muerte
Grupo 1 x 10⁶ DICC_{50%}/ml									
Ratón No. 1	+++	+++	+	++++	+	-	++	-	Muerte
Ratón No. 2	+++	+++	+	++++	+	-	++	-	Muerte
Ratón No. 3	+++	+++	+	++++	+	-	++	-	Muerte
Ratón No. 4	+++	+++	-	++++	+	-	++	-	Muerte
Ratón No. 5	+++	+++	-	++++	+	-	++	-	Muerte
Grupo 1 x 10⁵ DICC_{50%}/ml									
Ratón No. 1	+++	++	+	++++	++	+	++	-	Eutanasia
Ratón No. 2	+	-	-	+++	-	-	-	-	-
Ratón No. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 1 x 10⁴ DICC_{50%}/ml									
Ratón No. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 1 x 10³ DICC_{50%}/ml									
Ratón No. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 1 x 10² DICC_{50%}/ml									
Ratón No. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parálisis del tren anterior o posterior -: nulo. +: leve. ++: moderado. +++: agudo. ++++: hiperagudo

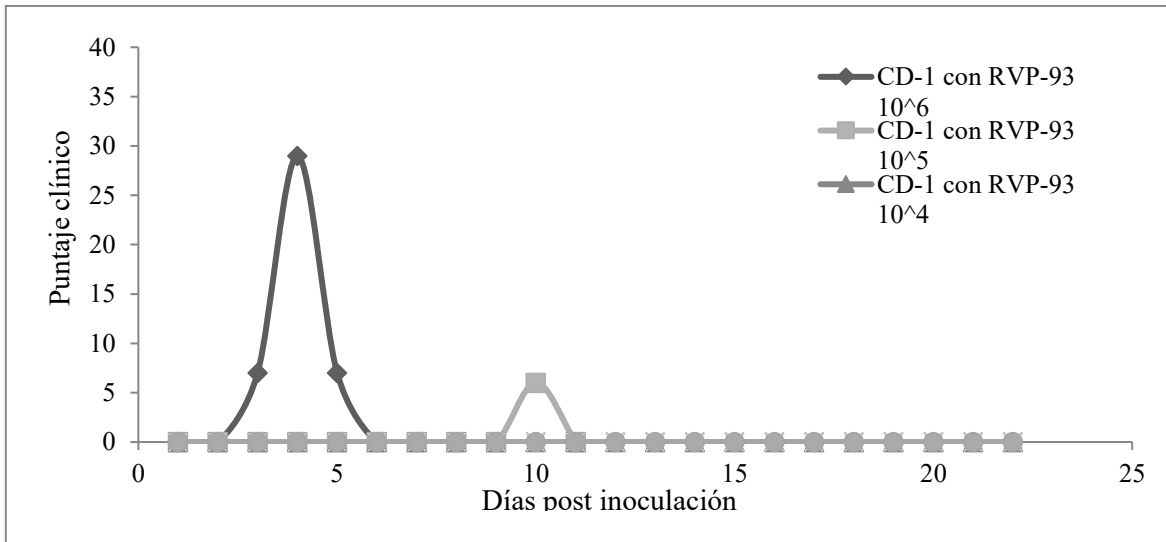


Figura 11. Comportamiento de la virulencia de RVP-93 en ratones CD-1.

Los ratones CD-1 del grupo inoculado con la cepa RVP-93 comenzaron a mostrar signos clínicos al cuarto día PI, los signos fueron menores en comparación con los grupos inoculados con las otras cepas (Cuadro 14 y Figura 11). Los ratones sobrevivientes junto con los del grupo control fueron monitoreados hasta el día 22 PI (Figura 12).

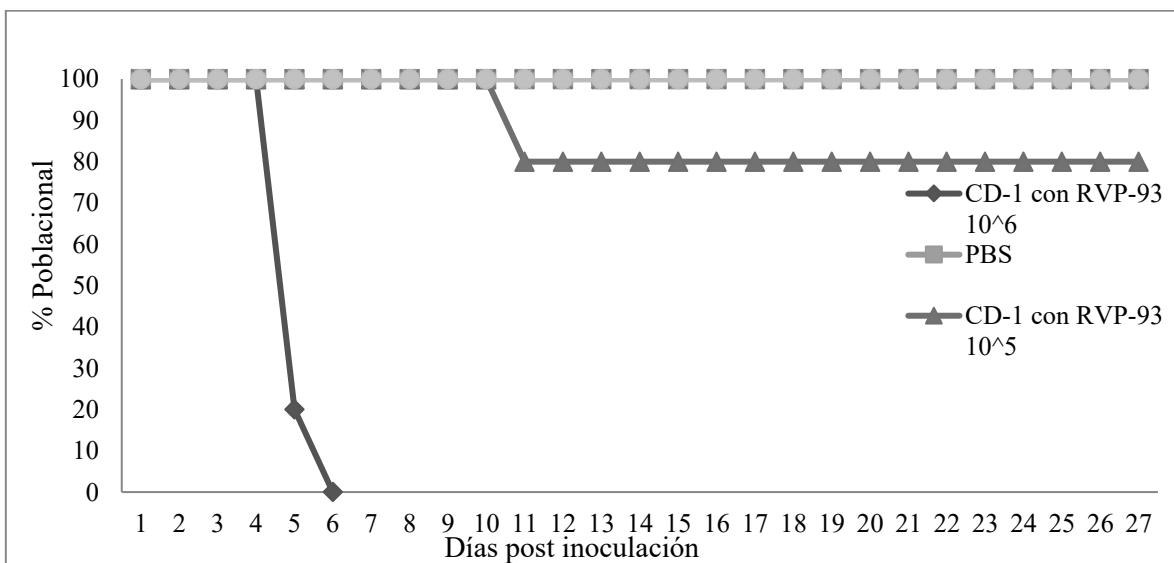


Figura 12. Supervivencia de ratones CD-1 inoculados con RVP-93

Cuadro 15. Signos clínicos observados a la inoculación de RVP-147 en los ratones CD-1.

Signo registrado	Neurológico			Respiratorio			Sistémico			
	Identificación	Temblores	Postración	Parálisis*	Disnea	Taquipnea	Respiración superficial	Encorvamiento	Pelo hirsuto	Eutanasia/muerte
Grupo 1 x 10⁶ DIC50%/ml										
Ratón No. 1	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 2	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 3	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 4	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 5	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Grupo 1 x 10⁵ DIC50%/ml										
Ratón No. 1	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 2	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 3	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 4	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 5	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Grupo 1 x 10⁴ DIC50%/ml										
Ratón No. 1	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 2	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 3	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Eutanasia
Ratón No. 4	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Eutanasia
Ratón No.5	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Eutanasia
Grupo 1 x 10³ DIC50%/ml										
Ratón No. 1	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Muerte
Ratón No. 2	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Eutanasia
Ratón No. 3	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Eutanasia
Ratón No. 4	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	Eutanasia
Ratón No. 5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 1 x 10² DIC50%/ml										
Ratón No. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratón No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Parálisis del tren anterior o posterior

-: nulo. +: leve. ++: moderado. +++: agudo. ++++: hiperagudo.

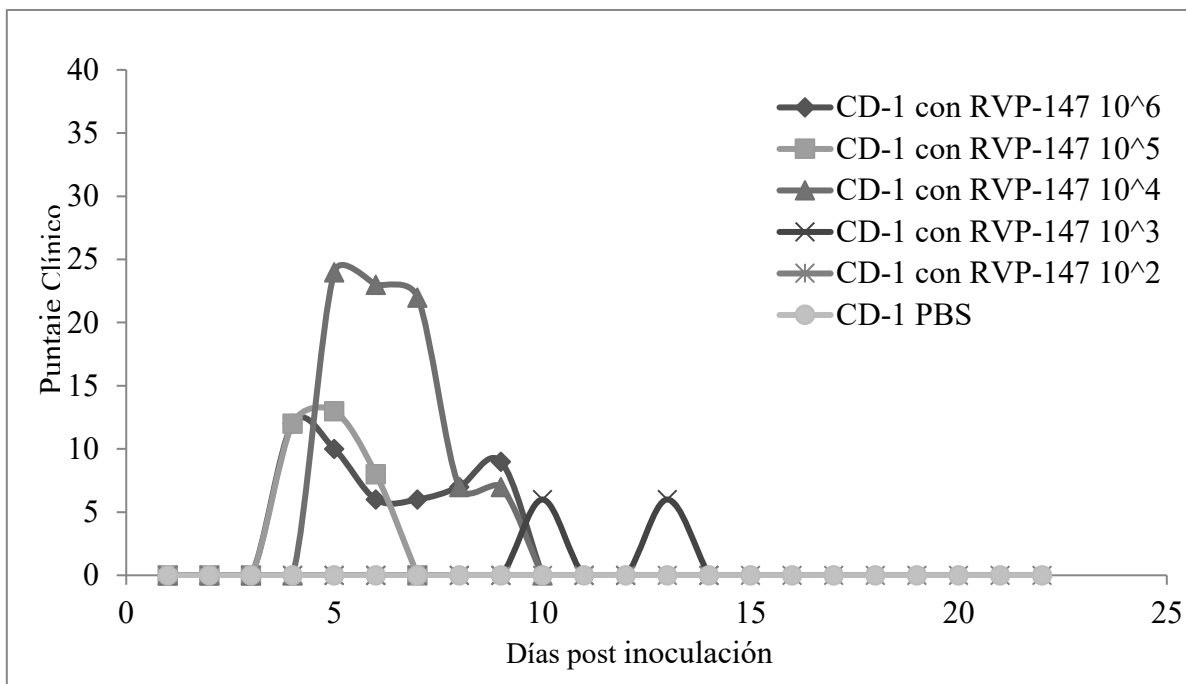


Figura 13. Comportamiento de la virulencia de RVP-147 en ratones CD-1

A partir del tercer día PI, los ratones CD-1 inoculados con la cepa RVP-147 comenzaron a manifestar signos clínicos (Cuadro 15 y Figura 13). Los sobrevivientes a la inoculación del virus, junto con los del grupo control fueron monitoreados hasta el día 22 PI (Figura 14).

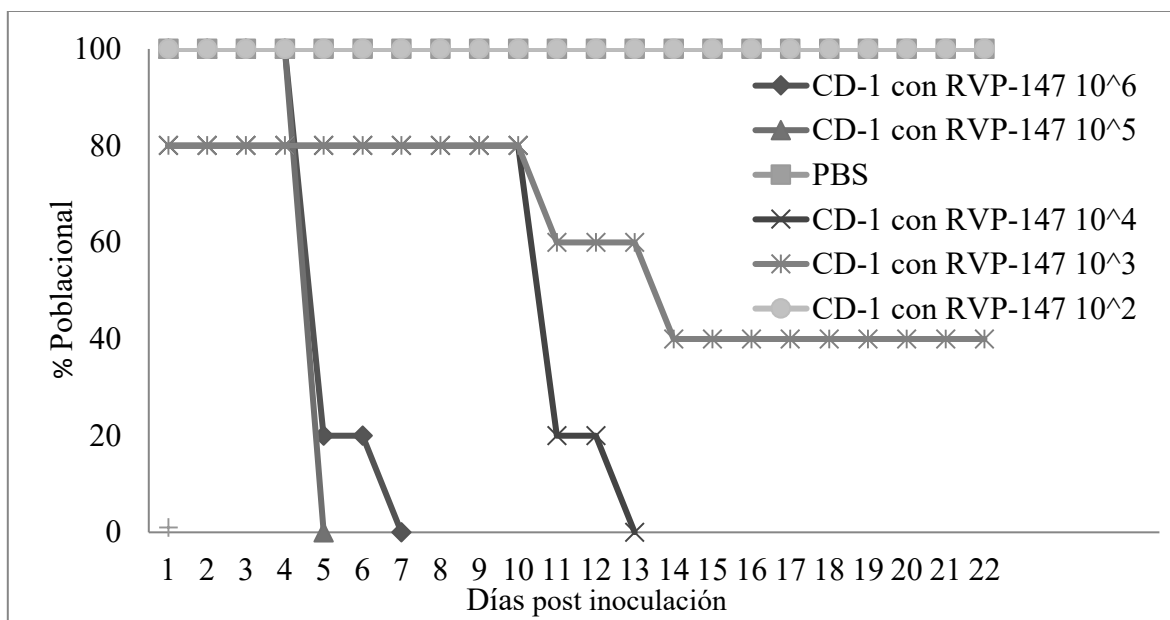


Figura 14. Supervivencia de ratones CD-1 inoculados con RVP-147

Con base en los datos recopilados, se calculó la dosis letal para cada cepa y línea de ratón, por medio de la fórmula de Reed & Muench (Cuadro 16; Anexo 1).

Cuadro 16. Dosis letal 50% calculada por cada línea de ratón y cepa viral empleada.

Cepa/línea de ratón	CD-1	BALB/c
RVP-VLPM	$10^{3.666}$ DL _{50%} /ml	No determinada*
RVP-93	$10^{2.166}$ DL _{50%} /ml	$10^{3.875}$ DL _{50%} /ml
RVP-147	$10^{3.666}$ DL _{50%} /ml	No determinada*

*La virulencia y letalidad de la cepa inoculada se presentó en todas las diluciones empleadas, por lo que no fue posible determinar la DL_{50%}.

7.3. Evaluación histológica de órganos de ratones inoculados experimentalmente con el RVP

Del total de órganos analizados con la tinción de hematoxilina-eosina (tráquea, pulmones, corazón, hígado, páncreas, bazo, riñones, vejiga, cerebro y cerebelo), los órganos en donde se observó alteración morfológica fueron cerebelo y pulmón (Figuras 15-18); hallando en tales órganos los siguientes cambios morfológicos:

En cerebelo, se detectó cambio morfológico en un aproximado del 10% al 45% de las células de Purkinje, observando en dichas células hipercromacidad basófila en el citoplasma (Figuras 15 y 17); pérdida de la estructura normal de la membrana, quedando reducidas en tamaño y con aspecto de células crenadas y en ocasiones con núcleos picnóticos, esta alteración fue observada en los dos grupos de ratones (BALB/c y CD-1) inoculados con la cepa RVP-VLPM.

En pulmón, se observó una neumonía intersticial no supurativa difusa de moderado a severo, el grado de severidad más alto se registró en los ratones (BALB/c y CD-1) inoculados con una concentración mayor del virus (Figura 16 y 18).

Los grupos más afectados se registraron conforme a las diluciones que fueron inoculadas del virus, empezando por el grupo 10^6 al 10^3 , y los signos se presentaron conforme a la dosis inoculada, primero en el grupo 10^6 y después en los demás grupos. A partir del segundo día PI en el grupo 10^6 , los ratones empezaron a mostrar signos nerviosos tales como encorvamiento y ataxia, conforme avanzaban los días, los mismos signos se presentaron en los otros grupos (10^5 , 10^4 y 10^3). Durante el proceso, los signos se agravaron y se manifestaron otros como incoordinación a la marcha, movimientos involuntarios de pedaleo, mioclonos, paresis de los miembros posteriores o anteriores, disnea, taquipnea con respiración superficial, postración total y por último la muerte se presentó entre los 4 a los 10 días PI, este efecto se observó de acuerdo a la susceptibilidad del individuo (descrito en las figuras de supervivencia), en los casos en donde se observó un cuadro de postración total, se procedió con la eutanasia.

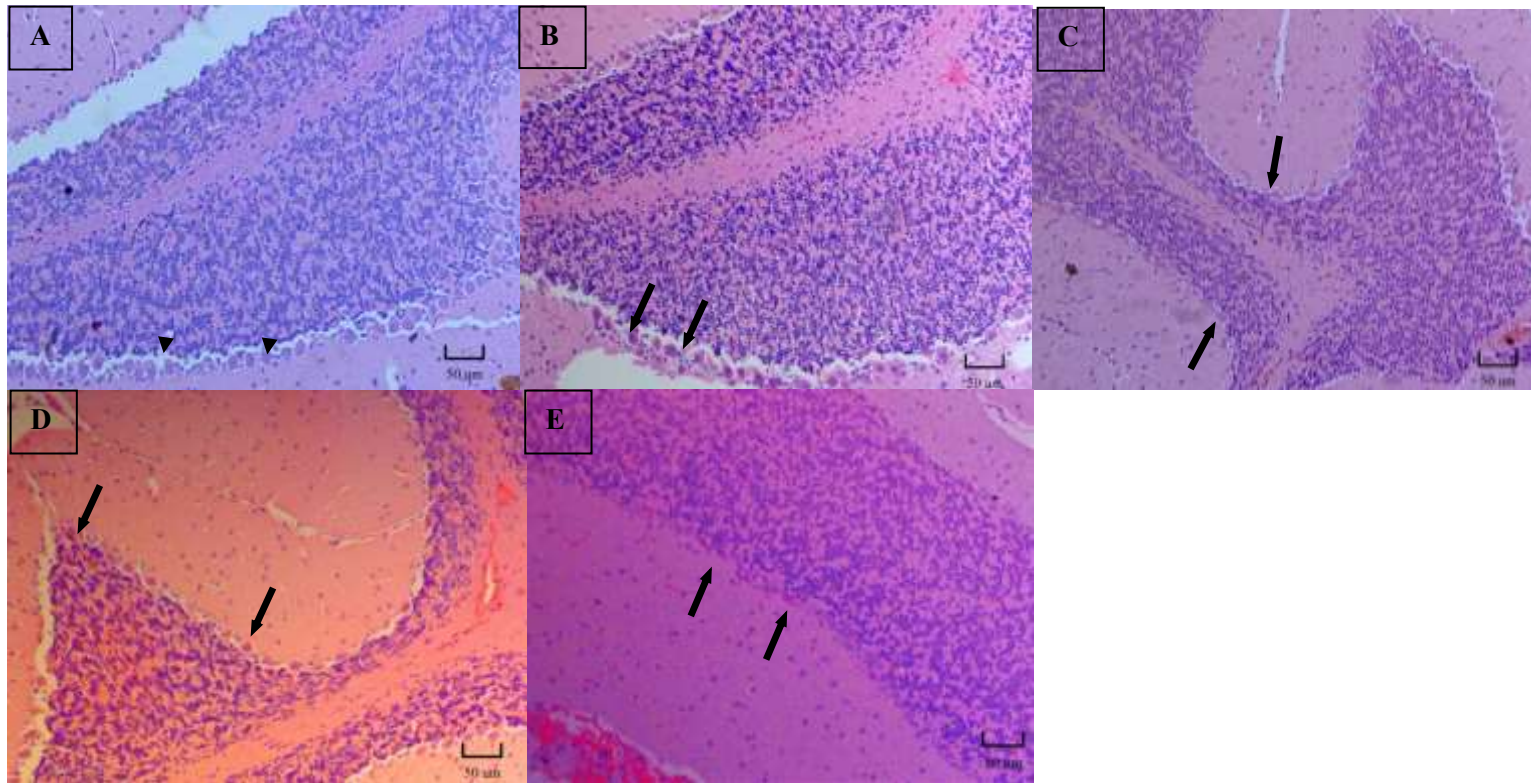


Figura 15. Imágenes histológicas de cerebelos de ratones CD-1 inoculados con RVP-VLPM. A) Ratón del grupo control inoculado con PBS. B) Ratón del grupo 10^6 . C) Ratón del grupo 10^5 . D) Ratón del grupo 10^4 . E) Ratón del grupo 10^3 . Las puntas de flecha señalan las células de Purkinje sin alteraciones. Las flechas completas señalan degeneración en la membrana con aspecto de células crenadas e hipercromaticidad en células de Purkinje (ampliación 10x).

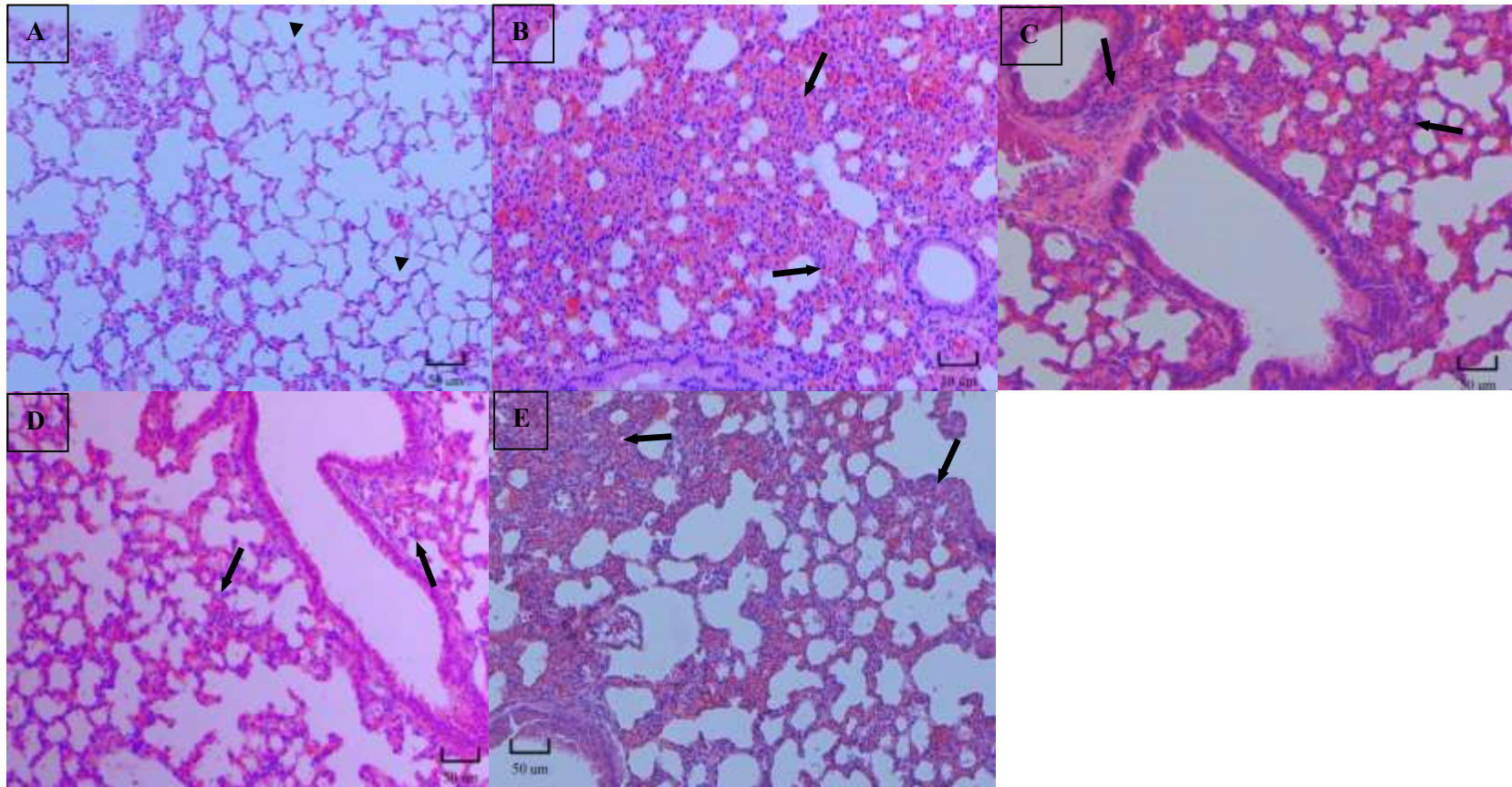


Figura 16. Imágenes histológicas de pulmones de ratones CD-1 inoculados con RVP-VLPM. A) Ratón del grupo control inoculado con PBS. B) Ratón del grupo 10^6 . C) Ratón del grupo 10^5 . D) Ratón del grupo 10^4 . E) Ratón del grupo 10^3 . Las puntas de flecha señalan las paredes alveolares sin alteración. Las flechas completas señalan el engrosamiento de las paredes alveolares que generan la neumonía intersticial no supurativa en diferentes grados de severidad (ampliación 10x).

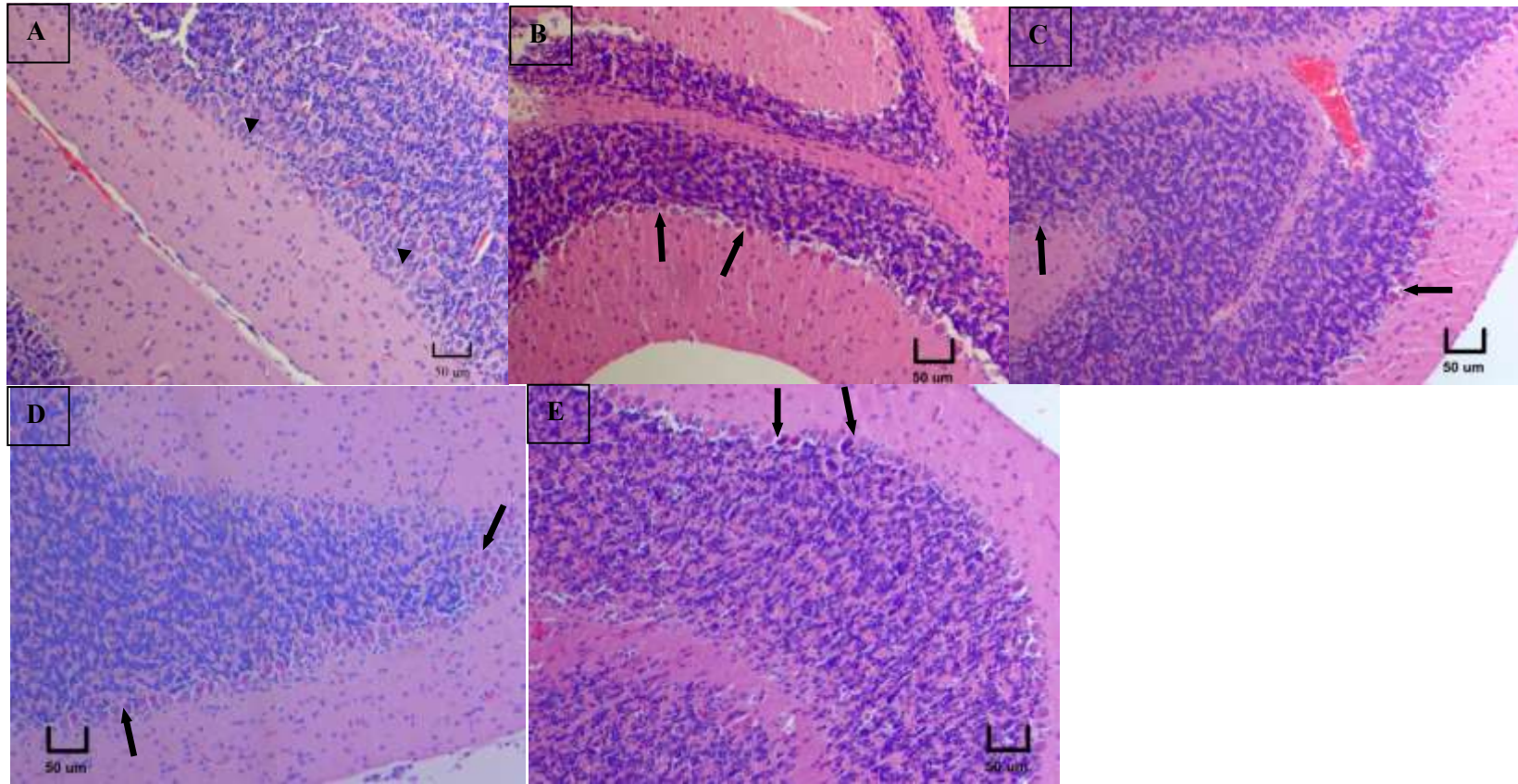


Figura 17. Imágenes histológicas de cerebelos de ratones BALB/c inoculados con RVP-VLPM. A) Ratón del grupo control inoculado con PBS. B) Ratón del grupo 10^6 . C) Ratón del grupo 10^5 . D) Ratón del grupo 10^4 . E) Ratón del grupo 10^3 . Las puntas de flecha señalan las células de Purkinje sin alteraciones. Las flechas completas señalan degeneración en la membrana con aspecto de células crenadas e hiper Cromaticidad en células de Purkinje (ampliación 10x).

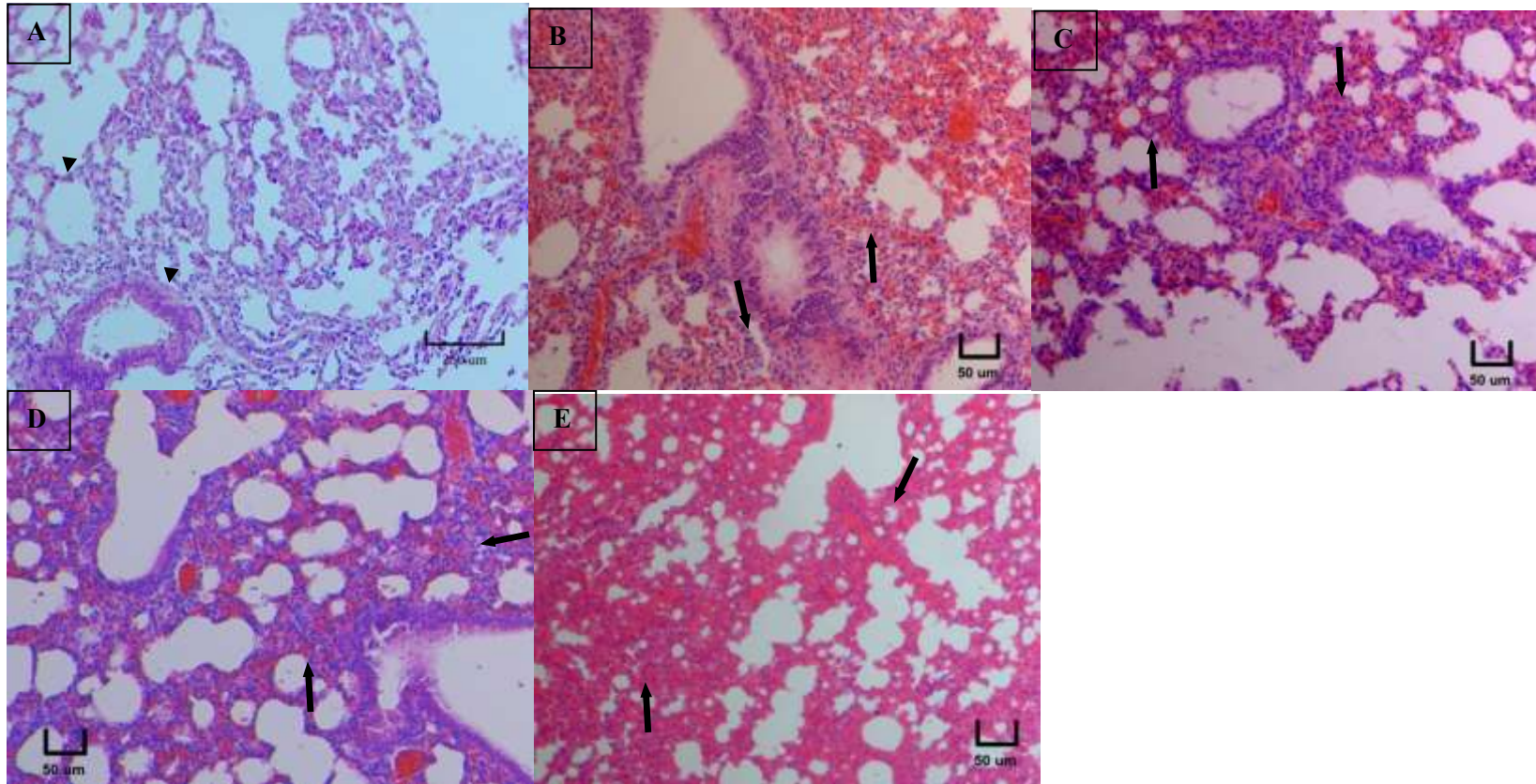


Figura 18. Imágenes histológicas de pulmones de ratones BALB/c inoculados con RVP-VLPM. A) Ratón grupo control inoculado con PBS (ampliación 4X). B) Ratón del grupo 10^6 . C) Ratón del grupo 10^4 . D) Ratón del grupo 10^3 . Las puntas de flecha señalan las paredes alveolares sin alteración. Las flechas completas señalan el engrosamiento de las paredes alveolares que generan la neumonía intersticial no supurativa en diferentes grados de severidad (ampliación 10x).

7.4. Cuantificación de la carga viral (virus infeccioso y ARN viral) del RVP en diferentes órganos de ratones inoculados

7.4.1. Aislamiento viral

De los ratones observados con signos clínicos, fueron procesadas 17 muestras tanto de encéfalo como de cerebelo de ratones que presentaron los signos clínicos más evidentes, se inocularon con las muestras maceradas primero a placas de 96 pozos sembradas con células PK-15; a las 72hrs de haber sido inoculadas se realizó una prueba de hemoaglutinación y hasta el tercer pase, tres pozos mantuvieron títulos de 1:32 y un daño celular leve pero característico.

Luego del tercer pase se realizó una infección con el sobrenadante de los pozos positivos en botellas de 25cm, en los cuales a las 72 hrs PI se observaron pequeños sincitios característicos y mantuvieron un título de 1:32 a la prueba de hemoaglutinación.

Las muestras en las que se evidenció hemaglutinación y efecto citopático en los cultivos, durante el aislamiento viral, se muestran en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Órganos de ratón CD-1 inoculados con la cepa RVP-VLPM de los cuales se logró aislamiento viral.

Órgano	Grupo inoculado	Día en que fue recolectado el tejido post inoculación
Cerebelo	10 ³	10 días PI
Encéfalo, hemisferio derecho	10 ⁴	4 días PI
Cerebelo	10 ⁵	8 días PI

7.4.2. Cuantificación del ARN viral por qRT-PCR

En los órganos procesados para la prueba de qRT-PCR, la mayor carga viral fue en encéfalos de los ratones del grupo 10⁵, y en los que menos carga viral se evidenció fue en los riñones de los ratones del grupo 10⁴, el órgano con resultados negativos (con excepción del grupo 10⁴) en los grupos inoculados fue el hígado. Conforme la inoculación contenía dosis bajas de partículas virales, los ratones presentaron menor carga viral y el porcentaje de los órganos blanco fue menor conforme la dosis inoculada, lo anterior se presenta en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Carga viral (ARN del RVP) registrada en diferentes órganos de ratones CD-1 inoculados con la cepa RVP-VLPM.

Órgano/ grupo experimental	10 ⁶ *	10 ⁵	10 ⁴	10 ³
Encéfalo	ND	3/5 (7.32)	2/2 (5.57)	ND
Tráquea	2/4 (5.96)	1/2 (3.8)	1/2 (4.52)	0/1
Pulmón	4/4 (6)	5/5 (4.1)	1/2 (4.16)	0/1
Corazón	4/5 (5.20)	2/4 (2.84)	0/2	0/1
Hígado	0/2	0/3	1/2 (5.79)	0/1
Bazo	5/5 (5.75)	3/5 (4.53)	3/3 (5.86)	1/2 (3.3)
Páncreas	ND	0/1	1/1 (4.97)	0/1
Riñón	1/5 (5.73)	2/4 (6.13)	1/3 (2.32)	0/3
Vejiga	0/1	1/3 (5.29)	0/2	1/2 (2.82)
Total de muestras positivas/total de muestras analizadas	16/26	17/32	10/19	2/12
Porcentaje de muestras positivas	61.5	53.1	52.6	16.6
Promedio de la carga viral (número de copias de ARN del RVP/ml expresado en Log₁₀)	3.27	3.77	3.68	0.76

*Número de ratones positivos/número de ratones analizados. Entre paréntesis se muestra el promedio del número de copias de ARN viral/ml expresado en Log₁₀ de los animales positivos. ND: no determinado

7.5. Análisis serológico

7.5.1. Inhibición de la hemaglutinación (IHA)

La seroconversión de los grupos experimentales fue analizada al finalizar el experimento (22 días PI), los ratones CD-1 con la cepa RVP-93 fueron los que registraron mayor cantidad de muestras positivas. El mayor título registrado se presentó en los ratones CD-1 con la cepa

RVP-147. En los ratones BALB/c solamente se registraron títulos de anticuerpos en los grupos experimentales 10^3 y 10^2 DICC, el resto de ratones no sobrevivieron a la inoculación experimental. Los datos promedio y la desviación estándar del título de anticuerpos de los grupos se presenta en el Cuadro 19.

Cuadro 19. Promedio del título de anticuerpos registrados en ratones de los diferentes grupos experimentales (log2).

Cepa/línea de ratón	CD-1				BALB/c			
	10^5 DICC	10^4 DICC	10^3 DICC	10^2 DICC	10^5 DICC	10^4 DICC	10^3 DICC	10^2 DICC
RVP-VLPM			4.32±0	4.92±0.54				
RVP-93	5.57±1.89	4.72±0.54	5.32±0	5.32±0			5.32 ^b	4.92±0.54
RVP-147			6.82±0.70	6.12±0.44				

^a: Los espacios en blanco significa que ningún ratón de ese grupo sobrevivió a la inoculación y no fue posible coleccionar su suero. ^b: Solamente se analizó un ratón sobreviviente. Se consideraron como muestras positivas los sueros con títulos iguales o mayores a 4.32 log₂.

7.5.2. Prueba de ELISA

La seroconversión, evaluada a través de la prueba de ELISA, confirmó el resultado registrado en la IHA, los sueros de los ratones CD-1 inoculados con la cepa RVP-93 (grupo 10^3 DICC_{50%}) fueron los que registraron mayor densidad óptica durante los ensayos (Cuadro 20). En varios grupos de sueros no fue posible la realización de la prueba ya que no se contó con suficiente volumen de suero.

Cuadro 20. Promedio de la densidad óptica registrada en la prueba de ELISA empleando sueros de ratones de los diferentes grupos experimentales

Cepa/línea de ratón	CD-1				BALB/c			
	10 ⁵ DICC	10 ⁴ DICC	10 ³ DICC	10 ² DICC	10 ⁵ DICC	10 ⁴ DICC	10 ³ DICC	10 ² DICC
RVP-VLPM			0.70±0.42	ND				
RVP-93	0.79±0.27	0.92±0.32	0.96±0.22	0.71±0.17			ND	0.64±0.13
RVP-147			ND	ND				

^a: Los espacios en blanco significa que ningún ratón de ese grupo sobrevivió a la inoculación y no fue posible colectar su suero. *Los sueros fueron procesados por cuadruplicado para obtener el promedio de la densidad óptica. Los sueros se consideraron como positivos cuando alcanzaron una densidad óptica superior a 0.30±0.05, de acuerdo a la densidad óptica de los sueros de ratones negativos. ND: no determinado.

8. Discusión

La inoculación intracraneal en los ratones de 26 a 28 días de edad, generó cuadros clínicos neurológicos y respiratorios, similares a los reportados en lechones menores a 30 días (Moreno-López *et al.*, 1986; Herrera, 2016). La relación entre los días en que se manifestaron los primeros signos es inversamente proporcional a la concentración viral inoculada, es decir, a mayor concentración viral, menor es el tiempo de presentación de los signos clínicos.

Comparando ambas líneas de ratón, los ratones BALB/c fueron más susceptibles a la inoculación con las diferentes dosis virales inoculadas, los grupos de ratones CD-1 fueron más resistentes ya que en diluciones altas del virus lograron sobrevivir algunos individuos, lo cual hizo posible calcular la dosis letal para las tres cepas virales empleadas.

Comparando las tres cepas virales, con base a lo observado durante el proceso en que se manifestaron cuadros clínicos, la cepa viral RVP-93 presenta una menor virulencia en comparación con las cepas RVP-VLPM y RVP-147 (ambas provenientes del estado de La Piedad Michoacán donde la enfermedad es considerada endémica). La cepa RVP-93 (proveniente del estado de Querétaro), al ser evaluada en los ratones, ocasionó un proceso infeccioso, sin embargo, aunque logró ocasionar mortalidad en las diferentes

concentraciones, algunos ratones toleraron la infección por lo que se pudo determinar en esta cepa la $DL_{50\%}$, en ambas líneas de ratón. En las cepas RVP-147 y RVP-VLPM no fue posible calcular la $DL_{50\%}$ en los ratones BALB/c debido a que aún con títulos virales de 1×10^2 DIC $_{50\%}$, los ratones tuvieron una alta sensibilidad a la infección.

En los dos grupos de ratones, BALB/c y CD-1, los animales que sobrevivieron a la infección, fueron empleados para detectar la presencia de anticuerpos por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación y ELISA. En ambos grupos de ratones fue posible detectar respuesta humoral, la seroconversión más alta se detectó en el grupo de ratones CD-1 inoculados con la cepa RVP-147, lo que indica que este virus tiene una capacidad antigénica mayor, comparada con las cepas RVP-VLPM y RVP-93, estos datos son similares a los reportados por Herrera (2016), al evaluar la respuesta inmune humoral en cerdos, empleando las mismas cepas virales.

Los resultados registrados en este estudio, coinciden con lo reportado por Cuetero *et al.* (1995), los cuales detectaron seroconversión por medio de IHA en ratas de la cepa Wistar inoculadas experimentalmente con el RVP. De acuerdo con ese estudio, los sueros de ratas son positivos desde los primeros 10 días PI y permanecen con títulos 1:8 a 1:64 entre los 10 y 35 días PI. En el presente estudio se detectaron títulos desde 1:20 hasta 1:320 en los diferentes grupos experimentales. Lo que demuestra la infección por el RVP, ya que existe una respuesta inmune detectable, sinónimo de replicación y adaptación del virus al hospedero. Existen antecedentes de detección de anticuerpos en roedores, sin embargo, estos estudios fueron realizados en animales de campo (Rosales *et al.*, 1987).

La respuesta humoral en ratones, evaluada a través de la prueba de ELISA, ha sido posible empleando proteínas recombinantes del RVP expresadas en dos diferentes sistemas (*Escherichia coli* y *Pichia pastoris*). Las pruebas de ELISA desarrolladas, en los ratones analizados en el presente estudio, fueron realizadas de acuerdo a lo reportado por Cuevas-Romero *et al.* (2016), en su investigación reportan seroconversión en ratones BALB/c inmunizados a partir de los siete días post inmunización, el pico máximo se registra a los 28 días con valores superiores a 1.5 unidades de densidad óptica (450nm). En los ratones

analizados en el presente estudio, la seroconversión más alta generó una unidad de densidad óptica en el grupo de ratones CD-1 con la cepa RVP-93, este valor que resulta bajo, comparado con los ratones del estudio de Cuevas-Romero *et al.* (2016), puede deberse a que no existió un segundo estímulo antigénico, tal como se realizó con la inmunización de la proteína recombinante con adyuvantes.

En otro estudio, Cerriteño *et al.* (2016), inmunizaron ratones CD-1 con una proteína HN recombinante obtenida en *P. pastoris*, posterior a una doble inmunización, detectaron seroconversión a los siete días post inmunización por medio de una prueba de ELISA, los valores de densidad óptica registrados posterior al segundo estímulo fueron inferiores a una unidad de densidad óptica (450nm), estos valores fueron similares a lo registrado en esta línea de ratón (CD-1), empleando las tres diferentes cepas de RVP. Los anticuerpos generados en el estudio de Cerriteño *et al.* (2016), si bien son inferiores a los reportados por Cuevas-Romero *et al.* (2016), demostraron tener capacidad neutralizante, ya que a través de un ensayo de placas líticas se observó que reducía la infectividad de 70 unidades formadoras de placas del virus en cultivo celular cuando se empleaba el suero a una dilución 1:8.

Con ambos estudios se confirma que la seroconversión de ratones, CD-1 y BALB/c contra RVP o la proteína HN del RVP es posible y puede ser evaluada a través de pruebas en donde se emplea antígeno activo (IHA y seroneutralización) o sin capacidad infectiva (ELISA)

El aislamiento viral en órganos del sistema nervioso de ratones fue posible en el grupo analizado, reportes experimentales han indicado que es posible detectar la presencia de virus con capacidad infectante en órganos de roedores (Cuetero *et al.*, 1995), incluidos órganos del sistema nervioso y respiratorio.

En la prueba de qRT-PCR se demostró que es posible detectar órganos blanco de replicación viral en los ratones y a la vez se puede calcular la carga viral mediante la prueba, lo cual ofrece un preámbulo para estudios posteriores sobre *Rubulavirus porcino* en modelos heterólogos como lo es el ratón, tanto de laboratorio como de campo, cuya posibilidad de ser un reservorio u hospedero accidental no es descartable de acuerdo a lo reportado por Correa

et al. (1986), Moreno-López *et al.* (1986) y Rosales *et al.* (1987) que reportaron la presencia del RVP en ratones.

En las observaciones realizadas al microscopio, a pesar de que la vía de inoculación fue intracraneal, los encéfalos no presentaron cambios morfológicos a causa de la infección, sin embargo, fue posible apreciar degeneraciones celulares en cerebelo y pulmones, lo que representó una diseminación del virus por el organismo de los ratones y posibles sitios de replicación con el mismo tropismo al que se apega el virus en la especie porcina.

9. Conclusiones.

- La inoculación experimental con *Rubulavirus porcino* (RVP) en el ratón de laboratorio, permite emplear esta especie como modelo biológico para la evaluación de las cepas virales de la enfermedad del ojo azul en cerdos.
- Los ratones menores a 30 días de edad BALB/c y CD-1 son susceptibles a la inoculación intracraneal de las cepas de *Rubulavirus porcino* (RVP).
- En ambas líneas de ratón BALB/c y CD-1 es posible evaluar cambios histológicos.
- La resistencia de los ratones de la línea CD-1 a la inoculación permite calcular la dosis letal 50% (DL_{50%}) y respuesta inmune humoral.
- Los ratones CD-1 pueden ser empleados para profundizar en las investigaciones sobre la virulencia de más cepas del RVP al cuantificar la carga viral mediante la prueba qRT-PCR.

10. Referencias

1. Alberti EA., Acosta AD., Sarmiento ME., Hidalgo CG., Fachado AC., Vidal TM., Leyva LJ. Respuesta humoral específica en ratones BALB/c inoculados con una librería genómica de expresión de *Trypanosoma cruzi*. Revista Cubana Medicina del Trópico. (1999) 51(1):20-5.
2. Arellanes EA., Fuentes R., Martha C., Carreón N. Rosalba, Ramírez HM. Inoculación experimental del Paramixovirus del ojo azul en el gato doméstico (*Felis catus*). Revista Veterinaria de México, (1994) 25(3):239-241.
3. Cerriteño-Sánchez JL., Santos-López G., Rosas-Murrieta NH., Reyes-Leyva J., Cuevas-Romero S., Herrera-Camacho I. Production of an enzymatically active and immunogenic form of ectodomain of *Porcine rubulavirus* hemagglutinin-neuraminidase in the yeast *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology, (2016) 223:52-61.
4. Correa GP., Martínez LA., Ericson A., Moreno-López J. Characterization of a *Paramixovirus* isolated from the brain of piglet in México. Proc. 9th IPVS Congress, Barcelona, Spain, (1986) 15-18, 205.
5. Cuetero SR., Ramírez HM., Carreón RN., Campuzano JG. Inoculación experimental del *Paramixovirus* del ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar), vía intramuscular. Revista Veterinaria de México, (1995) 26(3):231-235.
6. Cuevas-Romero S., Blomström AL, Berg M. Molecular and epidemiological studies of *Porcine rubulavirus* infection – an overview. Artículo de revisión. Infection and Epidemiology (2015) 5:29602.
7. Cuevas-Romero S., Rivera-Benitez JF., Hernández-Baumgarten E., Hernández-Jaúregui P., Vega M., Blomström AL., Berg M., Baule C., Cloning, expression and characterization of potential immunogenic recombinant hemagglutinin-neuraminidase protein of *Porcine rubulavirus*. Journal of protein expression and purification, (2016) 128:1-7.
8. Flurkey K., Brandvain Y., Klebanov S., Austad SN., Miller RA., Yuan R., Harrison DE. PohnB6F1: a cross of wild and domestic mice that is a new model of extended female reproductive life span. Journal Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Science, (2007) 62 (11): 1187-98.

9. Hernández J., Garfias Y., Nieto A., Mercado C., Montaña LF., Zenteno E. Comparative evaluation of the CD4⁺ CD8⁺ and CD4⁺ CD8⁻ lymphocytes in the immune response to *Porcine rubulavirus*. *Veterinary Immunology and immunopathology*, (2001) 79:249-259.
10. Hernández J., Reyes-Leyva J., Ramírez-Mendoza H., Valenzuela O., Zenteno E. Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el *Rubulavirus porcino*. *Revista Veterinaria de México*, (2004) 35(1):1-7.
11. Herrera BJC. Valoración clínica, serológica y carga viral en lechones infectados experimentalmente con nuevos aislamientos del *Rubulavirus porcino*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis de licenciatura. 2016.
12. Herrera MAR., Mendoza-Magaña ML., Dueñas-Jiménez JM., Mora-Galindo J., Dueñas-Jiménez H. Electrophysiological and morphological alterations in peripheral nerves by the pig *Paramixovirus* of blue eye disease in neonatal pigs. *Journal. Veterinary Medicine. B* (2001) 48, 477-487.
13. ICTV Taxonomy history: *Porcine rubulavirus*. (2015) Disponible en https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20161060 (12/04/2017)
14. Lang Y., Henningson J., Jaspersen D., Li Y., Lee J., Ma J., Li Y., Cao N., Liu H, Wilson W., Richt J., Ruder M., McVey S., Ma W. Mouse model for the Rift Valley fever virus MP12 strain infection. *Veterinary Microbiology* (2016) 195: 70-77.
15. Mendoza-Magaña ML., Diana V. Godoy-Martínez, Guerrero-Cazares H., Rodríguez-Peredo A., Dueñas-Jiménez JM., Dueñas-Jiménez SH., Ramírez-Herrera MA. Blue eye disease *Porcine rubulavirus* (PoRv) infects pig neurons and glial cells using sialoglycoprotein as receptor. *The Veterinary Journal* (2007) 173:428–436.
16. Martín del Burgo MÁ., Chinchilla BR., Del Real GS. La gripe porcina: una enfermedad clásica con carácter zoonótico y emergente. *Real Academia de Ciencias Veterinarias de la Andalucía Oriental. Anales*, (2009) 22(1):174-175.
17. Martínez LA, Correa GP, Rosales EF, Vásquez PC, Garibay SM. Curva de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) contra el paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán (LPM), en cerdos de una granja de ciclo completo. *Téc Pecu Méx* 1987 (25)2:163-167

18. Martínez LA., Correa GP., Zamora GJ. La enfermedad del ojo azul producida por el *Rubulavirus porcino*. INIFAP CENID-MA; (2006) Libro técnico No.1:5-6.
19. Martínez A., Gómez L., Diosdado F., Córdova D., Socci G., Coba MA., Carrera E., Zapata LE. Presencia del *Rubulavirus porcino* (RVP) en cerdos, de granjas comerciales, con problemas respiratorios y retraso de crecimiento. AMVEC; (2015).
20. Maschi F., Principi G., Rogers E., Ayala M., Cagliada P., Carbone C. Modelo de inmunodeficiencia: el ratón BALB/c.Cg-FoxI^{mu}. Revista *Química Viva*, (2011) 10 (3):214-218.
21. McNeilly F., Walker I., Allan G.M., Foster J.C., Linne T., Merza M, Hernandez P., Kennedy S., Adair B. A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacán paramixovirus (VLPM) infection in pigs. *Journal Veterinay Diagnosis Investigation* (1997) 9:9-3.
22. Moreno-López J., Correa-Girón P., Martínez A., Ericsson A., Characterization of a Paramixovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Archives of Virology* (1986) 91:221-231.
23. Morilla A., Kyoung-Jin Y., Zimmerman JJ. Trends in Emerging Viral Infections of Swine. A Blackwell Publishing Company, (2002) 3:59.
24. Morilla GA. Las enfermedades virales emergentes de los cerdos. *Ciencia veterinaria* (2003) 197-219. Disponible en [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c7.pdf](http://www.fm vz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c7.pdf)
25. Quintana J., Balasch M., Segalés J., Calsamiglia M., Rodríguez-Arriola GM., Plana-Durán J., Domingo M. Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. *Veterinary Research*. (2002) 33:229-237.
26. Ramírez HM., Martínez RG., Vizuet OTA., Monrroy JB. Inoculación del virus de la enfermedad del ojo azul en verracos de la raza Pelón Mexicano. *Revista Veterinaria de México*, (1999) 30(1):1-5.
27. Ramírez-Mendoza H., Carreón NR., Mercado GC., Rodríguez TJ. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del Paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Revista Veterinaria de México*, (1996) 27 (3) 257-259

28. Reyes-Leyva J., Santos G, Hernández J., Espinosa B., del Tránsito MB., Ramírez H., Vallejo V., Zenteno E. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el *Rubulavirus porcino*. Mensaje bioquímico, volumen XXVI. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. (2002) (ISSN-0188-137X).
29. Rinflerch AR, Burgos VL, Hidalgo AM, Loresi M, Argibay PF. Differential expression of disialic acids in the cerebellum of senile mice. *Glycobiology*. (2012) 22(3):411-416.
30. Rivera-Benítez J.F., Cuevas-Romero S., Blomström A-L, Ramliden M., Hernández-Baumgarten E., Hernández-Jaúregui P., Ramírez-Mendoza H. Mutaciones en la proteína V del *Rubulavirus porcino* revelan una posible atenuación natural. RNIP, México (2014) 1-2.
31. Rivera-Benitez JF., García-Contreras AC., Reyes-Leyva J., Hernández J., Sánchez-Betancourt JI., Ramírez-Mendoza H. Efficacy of quantitative RT-PCR for detection of the nucleoprotein gene from different *Porcine rubulavirus* strains. *Archives of Virology* (2013). 158 (9): 1849-56.
32. Rosales EF., Ramos RI., Sánchez-Mejorada PH. Correa GP. Anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH) contra el Paramixovirus porcino LPM en cerdas y ratas de las mismas granjas. Memoria. XXI Reunión Nacional de la Asociación Mexicana de Producción Animal, AMPA-87, Ciudad Victoria, Tamaulipas. (1987) 29-31. 164.
33. Salas-Rojas M., Sanchez-Hernandez C., Romero-Almaraz ML., Schnell GD., Kretschmer RS., Aguilar-Setien A. Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non-hematophagous bats captured in the Central Pacific coast of Mexico. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, (2004) 98:577-584.
34. Santos-López G., Hernández J., Borraz-Argüello MT., Ramírez-Mendoza H., Vallejo V., Reyes-Leyva J. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubulavirus porcino*. *Archivo Medicina Veterinaria XXXVI*, (2004) No 2:119-132.
35. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-027-ZOO-1995, Proceso zoonosario del semen de animales domésticos. (D.F.) (11 enero 1996) SAGARPA.

36. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, México (D.F.) (1999) SAGARPA.
37. Sundqvist A., Berg M., Hernández-Jauregui P., Linné T., Moreno-López J. The structural proteins of a *Porcine paramyxovirus* (VLPM). *Journal of General Virology*, (1990) 71:609-613.
38. Stephano HA.; Gay G.M., Ramírez TC., Maqueda AJ. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por virus hemaglutinante. Memoria. XVII Convención AMVEC-IXTAPA Guerrero (1981) 81.
39. Stephano A., Gay M. Síndrome de ojo azul en cerdos. Memoria AMVEC. Editado por P. Correa G. Y A. Morilla G. Centro médico nacional del IMSS México D.F., (1985) 1-13.
40. Wei L., Zhu S., She R., Hu F., Wang J. Viral replication and lung lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with avian metapneumovirus subgroup C isolated from chickens. *PLoS ONE* (2014) 9(3): e92136.

11. Anexo.

Fórmula de Reed and Muench para calcular la dosis letal 50% en el modelo animal.

$$DL50\% = \frac{\%de\ infecci3n\ por\ encima\ del\ 50\%-50\%}{\%de\ infecci3n\ por\ encima\ del\ 50\%-\%de\ infecci3n\ por\ debajo\ del\ 50\%}$$

A continuación, se presentan los datos colectados durante la fase experimental en el cuadro 1.

- Grupo BALB/c inoculados con RVP-93

Cálculo de $DL_{50\%}$ para el grupo de ratones BALB/c inoculados con RVP-93.

Cuadro 1. Datos empleados para calcular la $DL_{50\%}$ del RVP-93 en ratones BALB/c.

Dilución del virus	Animales muertos	Sobrevivientes	Valor acumulado muertos	Valor acumulado sobrevivientes	Proporción infectada	Porcentaje infectado
10	5	0	19	0	19/19	100
10 ⁻¹	5	0	14	0	14/14	100
10 ⁻²	5	0	9	0	9/9	100
10 ⁻³	4	1	4	1	4/5	80
10 ⁻⁴	0	5	0	6	0/6	0

Despejando: $DL_{50\%} = \frac{80-50}{80-0} = 0.375$

- Se corrige por el factor de dilución (log 10) que es 1 ($.0375 \times 1 = 0.375$)
- Se obtiene la distancia proporcional corregida y se suma a la dilución por encima del 50% ($2 + 0.375 = 2.375$)
- El título de virus fue $DL_{50\%} = 10^{2.375} DL_{50\%} / 0.03 \text{ml}$. Debido a que la dosis empleada fue en 0.03ml, se usa el logaritmo de 0.03 que es 1.5 y el resultado final es: $DL_{50\%} = 10^{3.875} DL_{50\%} / \text{ml}$.

El porcentaje del efecto total acumulativo por logaritmo de dilución en BALB/c inoculados con RVP-93 se muestra en la figura 1.

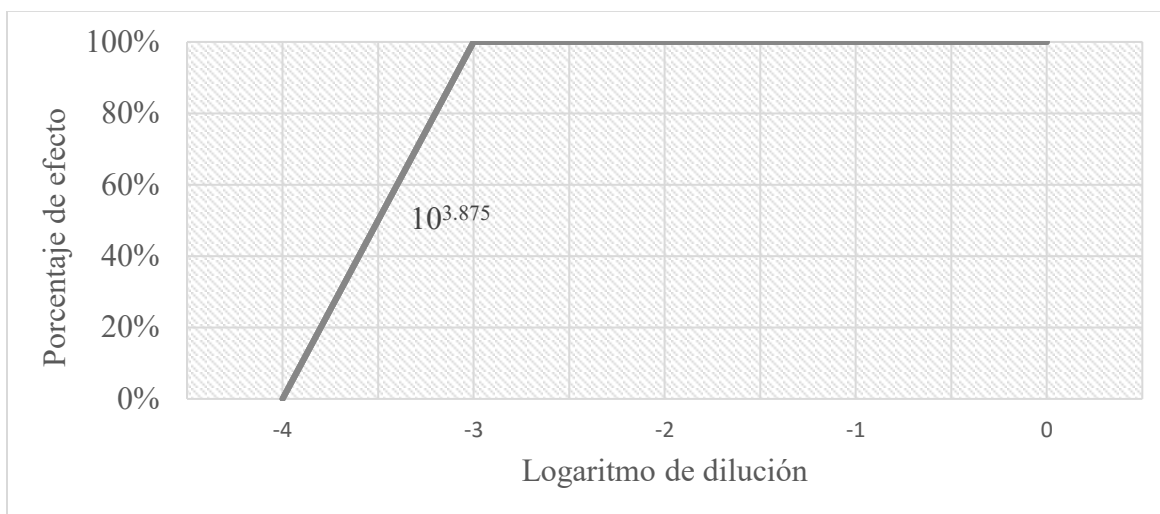


Figura 1. Porcentaje de efecto total (acumulativo) por logaritmo de dilución en BALB/c con RVP-93.

- Grupo CD-1 inoculados con RVP-93

Cálculo de $DL_{50\%}$ para el grupo de ratones CD-1 inoculados con RVP-93.

Bajo el mismo fundamento, se calculó la $DL_{50\%}$ para los ratones CD-1 inoculados con RVP-93 usando los valores que se muestran en el cuadro 2:

Cuadro 2. Datos empleados para calcular la $DL_{50\%}$ del RVP-93 en ratones CD-1.

Dilución del virus	Animales muertos	Sobrevivientes	Valor acumulado muertos	Valor acumulado sobrevivientes	Proporción infectada	Porcentaje infectado
10	5	0	6	0	6/6	100
10^{-1}	1	4	1	4	1/4	25
10^{-2}	0	5	0	9	0/9	0
10^{-3}	0	5	0	14	0/14	0
10^{-4}	0	5	0	19	0/19	0

Despejando: $DL_{50\%} = \frac{100-50}{100-25} = 0.666$

- Se corrige por el factor de dilución (log 10) que es 1 ($0.666 \times 1 = 0.666$)
- Se obtiene la distancia proporcional corregida y se suma a la dilución por encima del 50% ($0 + 0.666 = 0.666$)

- El título de virus fue $DL_{50\%}=10^{2.375} DL_{50\%}/0.03\text{ml}$. Debido a que la dosis empleada fue en 0.03ml, se usa el logaritmo de 0.03 que es 1.5 y el resultado final es: $DL_{50\%}=10^{2.166} DL_{50\%}/\text{ml}$.

El porcentaje del efecto total acumulativo por logaritmo de dilución en ratones CD-1 inoculados con RVP-93 se muestra en la figura 2.

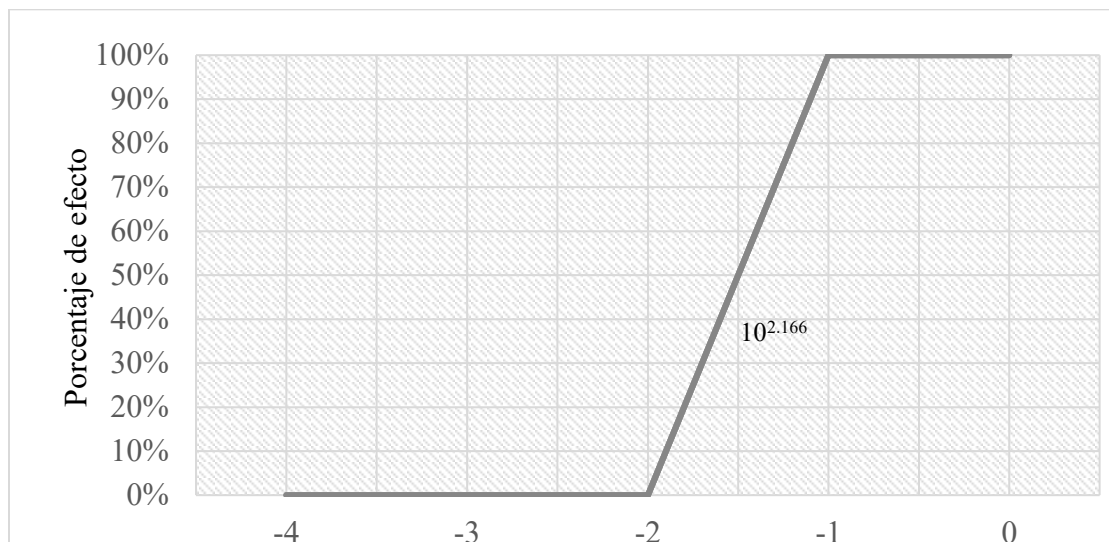


Figura 2. Porcentaje de efecto total (acumulativo) por Logaritmo de dilución CD-1 con RVP-93.

- Grupo CD-1 inoculados con RVP-147

Cálculo de $DL_{50\%}$ para el grupo de ratones CD-1 inoculados con RVP-147.

Para calcular la $DL_{50\%}$ en los ratones CD-1 inoculados con RVP-147 los valores que se ocupan se obtienen del cuadro 3:

Cuadro 3. Datos empleados para calcular la $DL_{50\%}$ del RVP-147 en ratones CD-1.

Dilución del virus	Animales muertos	Sobrevivientes	Valor acumulado muertos	Valor acumulado sobrevivientes	Proporción infectada	Porcentaje infectado
10	5	0	18	0	18/18	100
10^{-1}	5	0	13	0	13/13	100
10^{-2}	5	0	8	0	8/8	100
10^{-3}	3	2	3	2	3/5	60
10^{-4}	0	5	0	7	0/7	0

Despejando: $DL_{50\%} = \frac{60-50}{60-0} = 0.1666$

- Se corrige por el factor de dilución (log 10) que es 1 ($0.1666 \times 1 = 0.1666$)
- Se obtiene la distancia proporcional corregida y se suma a la dilución por encima del 50% ($2 + 0.1666 = 2.1666$)
- El título de virus fue $DL_{50\%} = 10^{2.1666} DL_{50\%} / 0.03 \text{ml}$. Debido a que la dosis empleada fue en 0.03ml, se usa el logaritmo de 0.03 que es 1.5 y el resultado final es: $DL_{50\%} = 10^{3.666} DL_{50\%} / \text{ml}$.

El porcentaje del efecto total acumulativo por logaritmo de dilución en ratones CD-1 inoculados con RVP-147 se muestra en la figura 3.

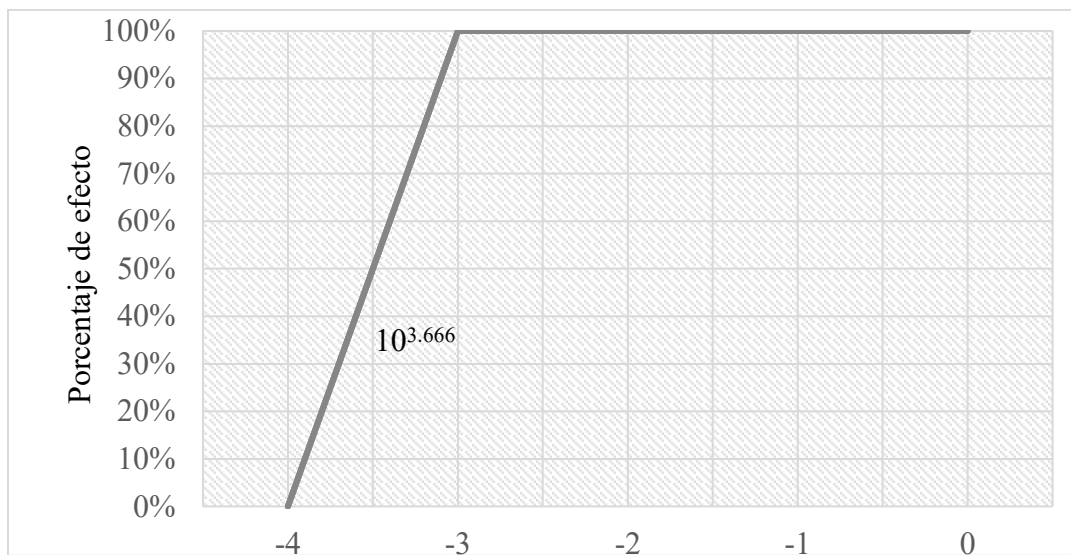


Figura 3. Porcentaje de efecto total (acumulativo) por Logaritmo de dilución CD-1 con RVP-147.

Grupo CD-1 inoculados con RVP-VLPM.

Cálculo de $DL_{50\%}$ para el grupo de ratones CD-1 inoculados con RVP-VLPM

Para calcular la $DL_{50\%}$ en los ratones CD-1 inoculados con RVP-VLPM, los valores que fueron ocupados se obtienen del cuadro 4:

Cuadro 4. Datos empleados para calcular la DL_{50%} del RVP-VLPM en ratones CD-1.

Dilución del virus	Animales muertos	Sobrevivientes	Valor acumulado muertos	Valor acumulado sobrevivientes	Proporción infectada	Porcentaje infectado
10	5	0	19	0	19/19	100
10 ⁻¹	5	0	14	0	14/14	100
10 ⁻²	5	0	9	0	9/9	100
10 ⁻³	4	1	4	1	4/5	80
10 ⁻⁴	0	5	0	6	0/6	0

Despejando: $DL_{50\%} = \frac{80-50}{80-0} = 0.375$

- Se corrige por el factor de dilución (log 10) que es 1 (0.1666x1=0.1666)
- Se obtiene la distancia proporcional corregida y se suma a la dilución por encima del 50% (2+0.1666= 2.1666)
- El título de virus fue $DL_{50\%}=10^{2.1666} DL_{50\%}/0.03\text{ml}$. Debido a que la dosis empleada fue en 0.03ml, se usa el logaritmo de 0.03 que es 1.5 y el resultado final es: $DL_{50\%}=10^{3.666}DL_{50\%}/\text{ml}$.

El porcentaje del efecto total acumulativo por logaritmo de dilución en ratones CD-1 inoculados con RVP-VLPM se muestra en la figura 4.

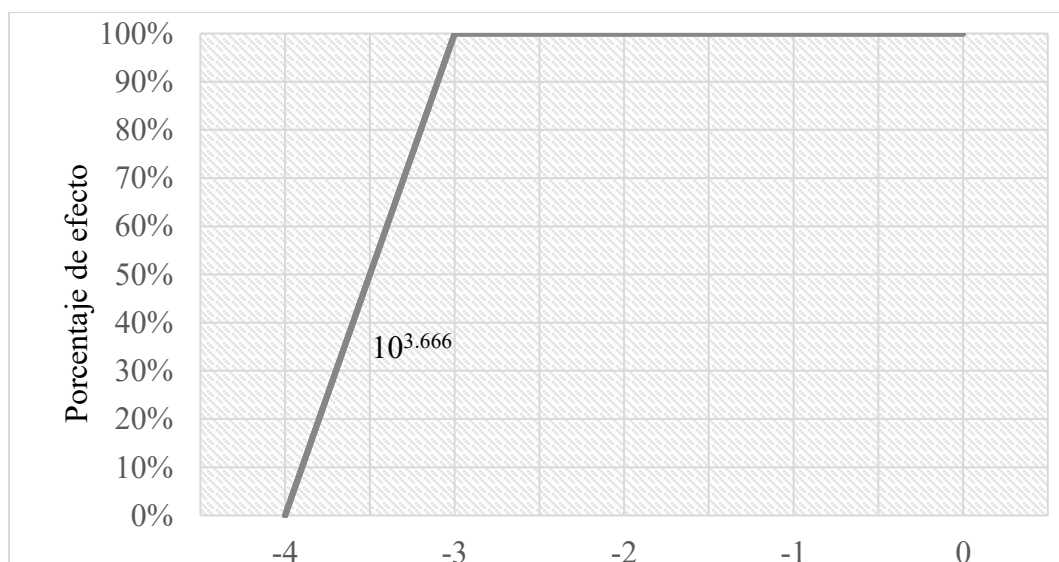


Figura 4. Porcentaje de efecto total (acumulativo) por Logaritmo de dilución CD-1 con RVP-VLPM.